

BIBLIOTHEEK
LEESMUSEUM
AMSTERDAM.

Afd.

N^o

Gen
5212

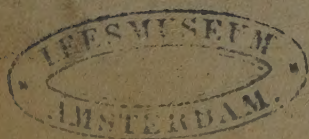
Thesis

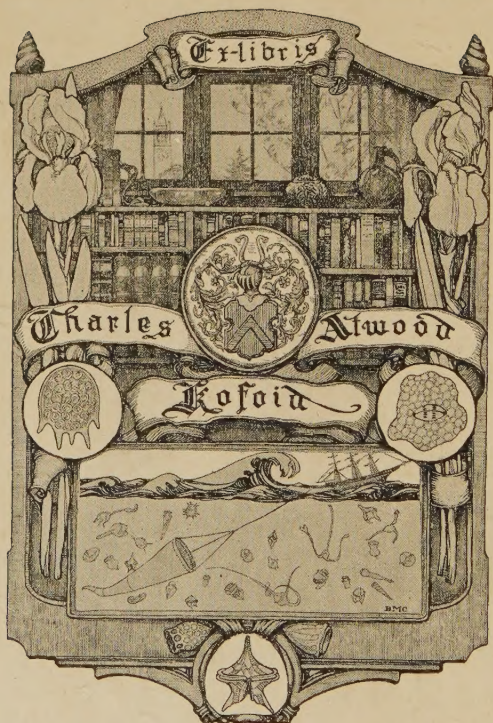
AMSTERDAM

5212
1918

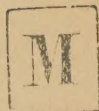
PROEVEN
OVER DE VERANDERLIJKHEID VAN
ATOXISCHE DYSENTERIE-BACILLEN

G. KORTHOF





PROEVEN OVER DE VERANDERLIJKHEID
VAN ATOXISCHE DYSENTERIE-BACILLEN



PROEVEN
OVER DE VERANDERLIJKHEID VAN
ATOXISCHE DYSENTERIE-BACILLEN

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
DR. K. KUIPER, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJS-
BEGEERTE, IN HET OPENBAAR TE VER-
DEDIGEN OP DONDERDAG 28 NOVEMBER
1918, DES NAMIDDAGS TE 4^{1/2} URE IN DE
AULA DER UNIVERSITEIT DOOR
GERRIT KORTHOF

OFFICIER VAN GEZONDHEID II^e KLASSE N.-I. LEGER,
GEBOREN TE NIEUWER-AMSTEL

AMSTERDAMSCH E BOEK- EN STEENDRUKKERIJ
VOORHEEN ELLERMAN, HARMS & CO. — 1918



Aan mijn Ouders.

Aan mijn Vrouw.

Aan het einde van mijn academische studiën, ter gelegenheid mijner promotie is het mij een aangename plicht U Hoogleeraren, Lectoren en Docenten der Geneeskundige Faculteit te danken voor het van U genoten onderwijs.

Inzonderheid U Hooggeleerde VAN LOGHEM, Hooggeachte Promotor, mijn hartelijken dank voor Uw steun en welwillende critiek, die mij in zoo ruime mate bij het bewerken van dit proefschrift gewerd. Uw lessen tijdens mijn verblijf aan de afdeling Tropische Hygiëne van het Koloniaal Instituut zullen mij in herinnering blijven. Het vele dat dit Instituut mij als voorbereiding voor mijn werkring in Indië heeft geschonken, zal ik eerst daar ten volle kunnen waardeeren.

Zeër erkentelijk Hooggeleerde KUENEN en Zeergeleerde SCHUURMANS STEKHOVEN ben ik voor het vele, dat ik onder Uw leiding heb mogen leeren.

U, Hooggeleerde BURGER betuig ik mijn dank voor de gastvrijheid, die ik op Uw polikliniek heb ondervonden.

Ten slotte dank ik allen die mij op eenigerlei wijze bij het bewerken van dit proefschrift van dienst zijn geweest.

INHOUD.

	BLADZ.
INLEIDING	1
HOOFDSTUK I.	
EENIGE FEITEN UIT DE ONTDEKKINGSGESCHIEDENIS DER DYSENTERIE-BACILLEN.	3
HOOFDSTUK II.	
INDEELING DER DYSENTERIE-BACILLEN	8
HOOFDSTUK III.	
ALGEMEENE OPMERKINGEN OVER VERANDERLIJKHEID BIJ BACTERIEN	19
HOOFDSTUK IV.	
HET MATERIAAL VAN HET ONDERZOEK EN ZIJN HERKOMST .	29
HOOFDSTUK V.	
VERANDERLIJKHEID IN DE SPLITSING VAN KOOLHYDRATEN DOOR ATOXISCHE DYSENTERIE-BACILLEN, ONDERZOCHT OP KUNST- MATIGE VOEDINGSBODEMS.	31
HOOFDSTUK VI.	
INVLOED VAN DEN GROEI IN WEEFSELVOCHTEN OP DE VER- ANDERLIJKHEID VAN ATOXISCHE DYSENTERIE-BACILLEN .	48
HOOFDSTUK VII.	
VERGELIJKING DER VERKREGEN VARIANTEN MET SEROLOGISCHE REACTIES.	57
BESLUIT	66

INLEIDING.

Door den oorlog is het vraagstuk der bacillaire dysenterie voor Europa in belangrijkheid toegenomen. Kwam vroeger in de oorlogvoerende landen slechts hier en daar een dysenterie-epidemie voor, — thans heerscht de ziekte voortdurend in de legers van beide partijen.

Telken jare keert ze weer, meest beginnend in het voorjaar om in den zomer haar hoogtepunt te bereiken. En behalve in het leger woedt ze ook in een andere kunstmatige bijeenhooping van menschen — in de gevangenkampen. Schier elke week zijn dan ook in buitenlandsche tijdschriften artikelen over dysenterie en hare bestrijding te vinden.

De beteekenis der bacillaire dysenterie is ook in de tropen erkend. Wat Nederlandsch-Indië betreft hebben ons na de onderzoekingen van GRYNs 1) en VAN LOGHEM 2) vooral de plantage- en legerartsen doen zien, welk een groot aandeel deze darmaandoening in de ziekte en sterfte daar te lande heeft.

Niettegenstaande het vele dat is bijgedragen tot de oorzakenleer der bacillaire dysenterie bestaat er

1) Geneeskundig Tijdschr. voor Ned.-Indië, Deel 48 en 49. 1908 en 1909.

2) Mededeelingen uit het Pathol. Lab. te Medan 1909. ibidem, Deel 49.

tusschen verschillende onderzoekers meeningsverschil over de wijze waarop de dysenteriebacillen behooren te worden gerangschikt.

Tijdens mijn detachering bij de afdeeling Tropische Hygiene van het Koloniaal Instituut ben ik in staat gesteld mij nader met het vraagstuk der rangschikking bezig te houden en dit aan een aantal dysenteriestammen van allerlei herkomst te bestudeeren.

HOOFDSTUK I.

EENIGE FEITEN UIT DE ONTDEKKINGS- GESCHIEDENIS DER DYSENTERIE-BACILLEN.

Na de ontdekking der thans als *Entamoeba tetragena* bekende amoëbe door LÖSCH bleek dat bepaalde vormen van dysenterie, bij welke geen amoëben werden gevonden, oorzakelijk verband houden met bacillen.

Eerste mededeelingen van dien aard door LAVERAN, CELLI, ESCHERICH, CALMETTE maar vooral door CHANTEMESSE en WIDAL 1) werden in 1899 bevestigd door SHIGA.

In Japan heerschte reeds tientallen jaren, telkens tusschen Juni en December, een heftige dysenterie-epidemie met ongeveer 25 % mortaliteit. SHIGA 2) kweekte nu in 36 gevallen uit faeces of darmwand van lijders aan dysenterie een op coli gelijkend staafje met geringe eigen beweging, waaraan echter geen zweepdraden waren aan te toonen. Het staafje was Gram-negatief, vervloeiide gelatine niet en vormde in tegenstelling met B.coli geen gas in glucosebouillon; vormde geen indol, kleurde lakmoeswei licht rood en liet zich helder evenals B.typhi. Dit zijn de hoofdeigenschappen, die SHIGA vaststelde.

Soms vond hij uitsluitend deze bacillen, maar in vijf van de 36 gevallen naast de bacillen amoëben.

1) Zie H. LÜPKE. Die Bazillenruhr 1911.

2) Centralblatt für Bakteriologie. Abt. 1. Or. Bd. 24. No. 22, 23 en 24. 1898.

SHIGA onderzocht nu 5 typhuspatienten, 4 patienten met enteritis en 2 met darmtuberculose. Bij hen werd de nieuwe bacil nooit gevonden. Ook werd de agglutinatiereactie van zijn dysenteriepatienten tegenover den gevonden bacil en van de bovengenoemde patienten en normale personen tegenover denzelfden bacil nagegaan. Bij de dysenteriepatienten lag de titer voor den eigen bacil hoog, terwijl bij de andere patienten en gezonde personen deze geheel negatief was.

Ten slotte werd de nieuwe bacil door geen bekend immuunserum (typhus-, cholera-, tetanus-, diphtherie-, tuberculose-serum) geagglutineerd.

Het dierexperiment deed zien dat de bacil zeer toxisch was voor Guineesche biggetjes en konijnen, maar SHIGA kon bij deze dieren met zijn bacil niet dezelfde darmprocessen opwekken als bij menschen, hoogstens een hyperaemie met haemorrhagiën.

Aan de vondst van SHIGA werd echter niet veel meer, ja bijna nog minder aandacht geschonken dan aan vroegere mededeelingen over dysenteriebacillen. Eerst de publicaties van KRUSE en de identificeering van den door hem gevonden bacil met dien van SHIGA hebben SHIGA's naam, als die van den eersten ontdekker der dysenteriebacillen, voor goed gevestigd.

KRUSE, die in Egypte met PASQUALE de amoeben-dysenterie bestudeerde, deed later onderzoekingen over de dysenterie in de Rijnprovincies. In 1900 was er een epidemie in het stadje Laar. Hier vond KRUSE 1) geen amoeben, maar een reincultuur van bacillen, die bij kweeken geen colibacillen bleken te zijn, want zij vergistten druivensuiker niet; evenmin typhusbacillen,

1) Deutsche med. Wochenschrift 1900 No. 40, 1901 No. 23 en 24.

want zij waren onbeweeglijk. Dierproeven mislukten evenals bij SHIGA, maar ook hier was de uitslag der agglutinatieproeven bij de zieken, vergeleken met die bij normale personen, niet twijfelachtig.

KRUSE dacht in het begin dat SHIGA (vooral wegens de door den laatste beschreven beweeglijkheid der bacillen) een ander organisme had ontdekt.

FLEXNER 1) vond bij een epidemie op de Philippijnen in 1899 een bacil, die alleen in slankheid en groei iets afweek van dien van SHIGA, maar die volgens FLEXNER ook geringe eigen beweging bezat. Deze eigenschap ging echter bij overenten snel verloren.

Bijna gelijktijdig kon STRONG (ook op de Philippijnen) uit de ontlasting van dysenterie-patienten een bacil kweken, die veel op dien van FLEXNER geleek.

Ten slotte hebben in Noord-Amerika VEDDER en DUVAL en kort daarop HISS en RUSSEL een bacil gekweekt, die bekend staat als Y-bacil of bacillus HISS-RUSSEL.

Dit zijn de meest bekende dysenteriebacillen. Later zijn er nog verscheidene bijgevonden, maar deze blijven voorloopig buiten beschouwing.

Ongeveer in denzelfden tijd dat KRUSE zijn onderzoek deed over den dysenteriebacil uit de epidemie te Laar, heerschte te Ouddorp op Goereë ook dysenterie. Prof. SPRONCK 2) uit Utrecht heeft hier bij 3 patienten bacillen gevonden, die naar hij meende iets van de door SHIGA gepubliceerde afweken. Ze waren namelijk niet beweeglijk. SPRONCK werd eerst geroepen toen de epidemie bijna voorbij was en er nog slechts een

1) Centralblatt für Bakteriologie. Abt. I. Or. Bd. 28. H. 19. 1900.

2) Ned. Tijdschrift van geneeskunde, 1902. Dl. II, No. 18.

paar zieken waren. Had SPRONCK een omvangrijk onderzoek kunnen instellen, stellig zou hij de eerste juiste beschrijving van den dysenteriebacil gegeven hebben. Nu wachtte hij. In September 1900 brak een nieuwe epidemie te Hattem uit. Dit lag dicht bij Utrecht en hier kon SPRONCK zijn onderzoek eerder beginnen. Juist toen deelde KRUSE zijn resultaten van het onderzoek van de epidemie te Laar in de Deutsche med. Wochenschrift mede. SPRONCK vond in Hattem op 7 onderzochte patienten 5 maal denzelfden bacil als te Ouddorp. Later is hij met zijn stammen naar Bonn gereisd om ze te vergelijken met die van KRUSE. Hier bleek de volkomen identiteit.

In 1901 isoleerde SPRONCK bovendien de andere vertegenwoordigers der dysenteriebacillen uit een epidemie in het Stedelijk Ziekenhuis te Utrecht. Hier bleek namelijk een bacil de oorzaak te zijn, die niet agglutineerde met sera, bereid met de bacillen uit Ouddorp, Hattem of Laar. Wel echter met sera, bereid met bacillen door KRUSE in krankzinnigen-gestichten geïsoleerd en door hem pseudodysenteriebacillen genoemd. Verder heeft SPRONCK reeds in 1901 3 gevallen van zomerdiarrhee bij kinderen onderzocht en daarbij bacillen gekweekt, die overeenkwamen met die uit het ziekenhuis te Utrecht.

Wij zien dus dat er reeds vroeg in ons vaderland met zorg over dysenterie werd onderzocht en dat het een louter toeval is te noemen dat wij van een SHIGA-KRUSE en niet van een SHIGA-SPRONCKbacil spreken.

Enkele gegevens uit de geschiedenis der dysenterie in Nederlandsch-Indië mogen nog vermelding vinden.

In 1909 verschenen van de hand van VAN LOGHEM mededeelingen uit het laboratorium te Medan, waarin

met zekerheid werd vastgesteld, dat in 1908 door hem dysenteriebacillen van het SHIGA-KRUSE type waren geïsoleerd. Wel hadden kort te voren reeds GRIJNS 1) en LIM op Java bacillen uit faeces van dysenteriepatiënten gekweekt, die zij als dysenteriebacillen konden aanmerken, maar het vergelijkingsmateriaal noodig voor de bevestiging der diagnose ontbrak hun.

Later heeft KUENEN in een belangrijk opstel over bacillaire dysenterie, door hem in Deli waargenomen (Geneesk. Tijdschrift van Ned.-Indië van 1915), aangetoond dat het bij zorgvuldig onderzoek en groote ervaring gelukt nagenoeg alle niet door amoeben veroorzaakte gevallen van dysenterie aetiologisch als bacillaire dysenterie te herkennen.

Nu zijn, zooals reeds is vermeld, door den oorlog de epidemieën van dysenterie zeer uitgebreid en daarmee ook onze kennis van de veroorzakers.

Over de moeilijkheden die zich voordoen bij de rangschikking dezer oude en nieuwe vondsten, in het bijzonder bij de beantwoording van de vraag of men slechts met variëteiten van één enkele bacteriesoort te doen heeft of met een veelheid van bacillen, hoop ik in de volgende hoofdstukken nog te spreken.

1) Geneesk. Tijdschrift voor Ned.-Indië. Dl. 48 en 49. 1908 en 1909.

HOOFDSTUK II.

INDEELING DER DYSENTERIE-BACILLEN.

Na de korte opsomming der ontdekkers van dysenteriebacillen komt de vraag aan de orde: Zijn alle dysenteriebacillen identiek of vertegenwoordigen zij verscheidene soorten? Aan een commissie, op aanraden van KOCH benoemd, bleek dat de bacillen van SHIGA en van KRUSE dezelfde waren. Van den SHIGA-KRUSEbacil zijn alle overige dysenteriebacillen scherp te scheiden. Aan deze hoofdindeeling wordt vrijwel door iedereen vastgehouden.

In 1917 heeft echter SCHMITZ in het Zeitschrift für Hygiene und Inf. Krankheiten, Bd. 84 H 3¹⁾ een dysenteriebacil beschreven, die dicht bij den SHIGA-KRUSEbacil staat, maar op enkele punten sterk van deze afwijkt. Het organisme vormt namelijk na 24 uur altijd en vrij veel indol en wijkt wat zijn agglutinatie betreft aanmerkelijk van den SHIGA-KRUSEbacil af. Wat zijn suikerreacties, toxiciteit en groei op gelatine aangaat, stemt het echter met deze overeen. In de Wiener klinische Wochenschrift 1918 No. 30 vermeldt HANS LAMPL, dat hij den bacil van SCHMITZ gevonden heeft in een paar op zichzelf staande gevallen.

De SHIGA-KRUSE dysenteriebacil (de bacil van SCHMITZ al of niet inbegrepen) is in zijn gedrag ten opzichte

1) Zie nader: Centralblatt für Bakteriologie. Abt. I, Or., Bd. 81, H. 4/5. 1918.

van onze onderkenningismiddelen vrij constant. Hier vertoont zich een scherp contrast met het wisselende gedrag der overige vormen, aan wier rangschikking dan ook moeilijkheden verbonden zijn.

Volledigheidshalve worde hier nog kort melding gemaakt van de theorie van SELIGMANN, die ook deze hoofdindeeling in SHIGA-KRUSE-bacillen en andere bacillen niet erkent. SELIGMANN heeft in het Centralblatt für Bakt. Abt. I, Or., (Bd. 79, H. 2 de volgende veronderstelling op grond van door hem waargenomen feiten uitgesproken. Hij schrijft: Elk jaar weer neem ik het volgende verschijnsel waar. De dysenterieëpidemie begint in den voorzomer en bereikt in den zomer haar top om met het najaar te eindigen. In het begin nu kweek ik altijd allerlei afwijkende typen dysenteriebacillen, die bij geen bekende soort zijn in te deelen. Naar het hoogtepunt van de epidemie toe komen meer de typische bekende vertegenwoordigers te voorschijn om bij de acme der epidemie uitsluitend uit SHIGA-KRUSE-bacillen te bestaan. Tegen het einde van de epidemie vind ik weer de afwijkende vormen. De slotsom hieruit luidt: De dysenteriebacillen zijn oorspronkelijk onschuldige saprophyten, die, of in den darm, of in de buitenwereld levend en in den darm komend, door ongunstige klimaatsinvloeden als koude en vochtigheid, die den hospes treffen, parasitair en invasief worden.

Deze hypothese is door verschillende onderzoekers op goede gronden weerlegd. Er zijn vele epidemieën nauwkeurig in haar geheel bacteriologisch vervolgd, waar niets is gebleken van de door SELIGMANN genoemde feiten, maar waar van begin tot eind dezelfde bacil als oorzaak werd gevonden. Al zijn de feiten door

SELIGMANN beschreven juist vastgesteld, dan nog is zijn verklaring te zeer in strijd met al het andere feiten-materiaal om ernstig overwogen te worden.

In La Presse Médicale 1918, No. 39 heeft A. ASCOLI, de meening verdedigd, dat de dysenterie in Europa slechts door één bacil wordt veroorzaakt en wel door den SHIGA-KRUSE-bacil. Alle andere zouden slechts door verschil in milieu van dezen afwijken. Hij gaat dus niet zoo ver als SELIGMANN.

Als wij nu de tweede groep beschouwen, raken wij in verlegenheid. Al dadelijk wat hun naam betreft. KRUSE spreekt van *pseudo-dysenterie-bacillen*; ten onrechte, omdat de betreffende organismen in staat zijn „echte” dysenterie te veroorzaken. Paradyenterie-bacillen, de naam door KRUSE gegeven aan bacillen die DEYCKE en RESHAD in Constantinopel vonden, zou ook in analogie met typhus- en para-typhusbacillen, zeker juister geweest zijn. KRUSE was echter, toen hij de „pseudo”-dysenteriebacillen uit de ontlasting van verpleegden uit krankzinnigengestichten isoleerde, van meening, dat deze, wat hun pathogeniteit betreft, ver van de echte dysenteriebacillen afstonden en na het lezen van de publicatie van DEYCKE en RESHAD, dat deze bacillen zeer verwant waren aan zijn eerst gevonden bacillen. Bij nader onderzoek bleek aan KRUSE dat de bacillen van DEYCKE en RESHAD beweeglijk waren en melk coaguleerden, dus veel dichter bij *B. coli* stonden. KEMP, 1) die ze nog eens onderzocht, beschouwt ze dan ook als een *coli*-soort bij gevallen van dysenterie gevonden. Meer zullen we over deze paradyenteriebacillen niet schrijven.

1) Zeitschrift für Hygiene und Infekt. Krankheiten, 1907. Bd. 57.

Engelsche onderzoekers gebruiken veelal ter onderscheiding der dysenteriebacillen, namen ontleend aan zekere eigenschappen. Zij spreken dan van „*acid*” en „*non-acid group*” of „*mannite-fermenting*” en „*non-fermenting group*”. Aangezien de SHIGA-KRUSE-bacil ook zuur vormt (uit glucose) en zekere „pseudo”-dysenteriebacil, namelijk de X-bacil (VAN DEN BOSCH), geen manniet omzet is deze benaming noch praktisch noch theoretisch gerechtvaardigd.

Beter komt het mij voor de vorming van toxinen als grondslag der verdeeling te aanvaarden, ook al is hier een theoretisch bezwaar tegen in te brengen. Praktisch laat zich toch de SHIGA-KRUSE-bacil, door zijn toxiciteit en grootere virulentie van de weinig of niet vergiftige „atoxische” typen onderscheiden. Ik volg dus het voorbeeld van hen die de „pseudo”-dysenteriebacillen van KRUSE liever als *atoxische dysenteriebacillen* aanduiden.

* *
*

Omtrent de indeeling der atoxische dysenteriebacillen bestaan nog groote meeningsverschillen.

KRUSE heeft in 1907 een nauwkeurige indeeling der atoxische dysenteriebacillen gegeven. Zooals gezegd isoleerde hij zijn „pseudo”-dysenteriebacillen uit faeces van verpleegden uit kranzinnigengestichten. Zoowel door hun mindere giftigheid bij het immuniseeren van dieren als door hun agglutinatie onderscheiden ze zich van de „echte” dysenteriebacillen. Zijn indeeling geeft hij in een artikel 1): Dysenterie und

1) Zeitschrift für Hygiene und Infekt. Krankheiten, 1907, Bd. 57, H. 3.

Pseudo-dysenterie, waarin hij het resultaat zijner onderzoekingen met hulp van RITTERSHAUS, KEMP en METZ verricht, weergeeft. Hij heeft met deze medewerkers een groot aantal agglutinaties en absorptieproeven volgens CASTELLANI gedaan en komt op grond hiervan tot de soorten A, B, C, D, E, F en G. Hij onderzocht naast de agglutinaties een groot aantal suikerreacties 1) (waar wij later op terugkomen) maar wijst op hun onbetrouwbaarheid. De eenige die hij betrouwbaar vindt is die met het door LENTZ ingevoerde manniet. Hij zegt: Für die Gruppierung der Ruhrbacillen ist dieser sechswertige Alcohol das einfachste Mittel. Maar de maltose heeft volgens KRUSE geen waarde. Reeds HISS had variabele stammen gevonden, die nu eens maltose wel, dan weer niet omzetten. Bovendien vond KRUSE in tegenstelling met HISS en LENTZ, dat ook de agglutinatie in 't geheel niet parallel loopt met het al of niet omzetten van maltose. Hetzelfde oordeel wordt geveld over saccharose. Dextrine als lichaam zonder constante samenstelling komt niet in aanmerking bij KRUSE.

Daarom berust de indeeling van KRUSE uitsluitend op agglutinatie en absorptieproef.

Maar er zijn ernstige bezwaren tegen ingebracht. M. WASSERMANN heeft in het Zeitschr. für Hyg., Bd. 71, blz. 241, een stam beschreven die met de absorptieproef zoowel bij stam A als D hoorde. En dit voorbeeld is met vele vermeerderd. Bovendien zijn er stammen gevonden die bij geen der genoemde soorten van KRUSE zijn in te deelen. KRUSE zelf heeft dan ook reeds de soorten H, I en J aan zijn indeeling toege-

1) Onder „suikers” wordt dan ook manniet gerekend.

voegd. En nog is dit aantal niet voldoende. Dat dientengevolge het aantal agglutinaties en absorptieproeven dat men doen moet om een gevonden bacil te determineren praktisch te groot wordt, is makkelijk in te zien, evenzeer als het feit dat met de toeneming der groepen de theoretische waarde der indeeling gevaar loopt.

Een andere indeeling gaf LENTZ 1). Deze is de meest bekende en meest gebruikelijke. Ze is in hoofdzaak niet gebaseerd op serumreacties maar op de „suiker”-proef. LENTZ gebruikt hiervoor drie koolhydraten buiten de lactose en glucose, die altijd moeten onderzocht worden. Want eerste vereischte voor alle dysenteriebacillen is, dat ze lactose niet, glucose wel omzetten. Daarbij gebruikt LENTZ nu manniet, maltose en saccharose. Manniet en maltose zijn bijna gelijktijdig en onafhankelijk van elkaar zoowel door LENTZ als door HISS en RUSSEL gebruikt in den vorm van lakmoesmannietagar volgens DRIGALSKI. Later heeft HISS er de saccharose bijgenomen en weer ingevoerd het reeds door de Japanners gebruikte lakmoespeptonwater.

LENTZ maakt op grond van deze koolhydraten de volgende bekende indeeling:

	Manniet.	Maltose.	Saccharose.
Shiga-Kruse.....	—	—	—
Flexner.....	+	+	—
Y.....	+	—	—
Strong	+	—	+

LENTZ vindt de agglutinaties vrij goed in overeen-

1) W. KOLLE und A. v. WASSERMANN, Handbuch der pathog. Microorganismen. 2e Uitg. Bd. III, blz. 899.

stemming met de suikerreacties. Het is zeker een eenvoudige en makkelijke indeeling. Maar ze is niet juist. Reeds boven werd vermeld dat KRUSE in 1907 wees op stammen die nu eens maltose of saccharose aantasten, dan weer niet. En behalve dit loopten suiker-reactie en agglutinatie lang niet altijd gelijk. LENTZ zelf erkent dit deels, maar zegt, dat als men de bacillen dadelijk na isolatie onderzoekt, het resultaat altijd zeker is. Hij voegt er aan toe dat als de bacillen pas geïsoleerd zijn, ze sterker aviditeit voor pepton hebben en er dus veel suiker genomen moet worden. Maar al wordt de indeeling van LENTZ nog algemeen gebruikt, de afwijkingen van het schema door LENTZ opgesteld zijn vrijwel even veelvuldig als de gevallen die in het schema passen. Ook uit één patient kan men op verschillende dagen verschillende soorten volgens het systeem van LENTZ kweken (HEHEWERTH 1). En het aantal stammen dat nu eens zich als „Y” gedraagt, dan weer als Flexner, is groot. HEHEWERTH (1916) 1), C. J. MARTIN (1918) 2) en velen met hen komen dan ook tot de conclusie dat wegens de variabiliteit in suiker-reacties en het niet parallel gaan van suiker-reactie en agglutinatie het schema van LENTZ practisch geen waarde heeft en dat zoolang er geen betere indeeling is, het alleen rationeel is om te spreken van toxische en atoxische dysenterie-bacil en geen verdere indeeling te maken.

Naast deze twee meest bekende en voornaamste indeelingen zijn nog vele andere te vinden. Vooral wat de suiker-reacties betreft. Men heeft meer koolhydraten er bij genomen.

1) Centralblatt für Bakteriologie. Abt. I, Or, Bd. 78, H. 1. 1916.

2) The Journal of Hygiene. Vol. 16, No. 3. 1918.

SHIGA heeft met OHNO 74 Japansche stammen onderzocht. OHNO kwam tot 15 soorten, n.l. 6 die manniet niet omzetten en 9 die dit wel doen. Maar SHIGA heeft deze 15 tot 5 typen teruggebracht.

In het Zeitschr. für Hygiene, 1908 Bd. 60, H. 1, geeft hij het volgende schema:

	Dextrose.	Manniet.	Saccharose.	Maltose.	Dextrine.	Lactose.
Original type I....	+	—	—	—	—	—
Var. 1 type II....	+	+	—	—	—	—
Var. 2 type III....	+	+	+	—	—	—
Var. 3 type IV....	+	+	+	+	+	—
Var. 4 type V....	+	±	+	+	+	—

Hij beschouwt de atoxische dysenteriebacillen als variëteiten van één en denzelfden stam en wijst op analoge variëteiten bij pest, cholera, prodigiosus en varkenspestbacillen.

Hiss 1) heeft in 1904 een indeeling gegeven in 4 stammen op de volgende wijze:

Group I (SHIGA-culture) ferments dextrose.

Group II (Y-culture) " " and mannit.

Group III (Strong-culture) " " " " and saccharose.

Group IV (Flexner-Manila) " " " " " " maltose and dextrin.

Hij komt dus op grond van 5 „suikers”, waaronder glucose en dextrine, tot dezelfde indeeling als LENTZ. Hoe weinig betrouwbaar deze suiker-reacties zijn, bewijst wel het feit dat Hiss vaststelde dat „the cultures from the insane (van KRUSE) were in all probability identical with the mannit-splitting culture known as Flexner”, terwijl LENTZ ze als Y-bacillen aanmerkte.

1) Geciteerd door J. C. TORREY. From the department of experimental pathology. Cornell University 1905.

BAERMANN en SCHÜFFER 1) die overigens aan de indeeling van KRUSE vasthielden, werkten in 1909 nog met 8 suikers en vonden dan een redelijke overeenstemming met het schema van KRUSE.

Maar het maximum bereikt H. DE R. MORGAN 2), die met niet minder dan 24 koolhydraten werkt (suikers en alcoholen). Hij zegt een veel fijnere indeeling verkregen te hebben dan door agglutinatie of absorptieproef van CASTELLANI mogelijk is. Dat hij een groot aantal soorten diagnostiseerde is niet te verwonderen, maar dat zijn schema in de praktijk bruikbaar is, is moeilijk aan te nemen.

In Indië heeft men met het schema van LENTZ werkend, naast de drie atoxische bacillen van LENTZ nog een vierde soort gevonden die door KUENEN ter eere van den assistent aan het Pathologisch Laboratorium te Medan X. v. D. BOSCH is genoemd. Deze bacil zet manniet en saccharose niet om, maltose wel, vormt geen indol en geen toxinen en wordt door „Y”- en „Flexner”-sera geagglutineerd of mee-geagglutineerd. De pathogeniteit van dezen bacil staat nog niet vast.

Behalve agglutinatie en absorptieproef van CASTELLANI heeft men ook de complementbindingsmethode te baat genomen om een indeeling in de groep der atoxische dysenteriebacillen te bewerkstelligen. Ook dit is mislukt. KOLLE, HELLER en DE MESTRAL, WASSERMANN en vele anderen die het probeerden, konden niet tot een resultaat komen. AMAKO en KOJIMA, twee Japanners, vonden, dat als ze antiserum namen van dieren met lagen titer, die pas geïmmuniseerd waren, er wel een

1) Münch. medicin. Wochenschrift 1909, No. 8.

2) Journal of Hygiene. Vol. XI, No. 1. 1911.

goed resultaat te bereiken viel. Echter kwam ook hier groepswijze reactie voor. En latere onderzoekers hebben ook hun conclusie verworpen 1).

Uit een en ander, dat slechts een korte aanduiding is van het vele dat over dit onderwerp is meegedeeld, blijkt dat we niet beschikken over een bruikbare indeeling der atoxische dysenterie-bacillen. Daarop te laten volgen: The separation of the mannit-fermenting dysenterybacilli into groups on the ground of their action upon the above carbohydrates is unsound (MARTIN) 2) of: Diese beiden Tatsachen, die Unbeständigkeit der Zuckerreaktionen und ausserdem das Nichtparallelgehen der Zuckerreaktionen mit den agglutinatorischen Resultaten, sind meiner Meinung nach ein genügender Grund um eine Einteilung, welche sich auf die Zuckerreaktionen stützt, zurückzuweisen (HEHEWERTH) 3) laat wellicht te veel de moeilijkheid terzijde liggen.

Dat schijnbaar willekeurige gedrag der atoxische dysenterie-bacillen tegenover de genoemde koolhydraten vraagt een verklaring.

WINTER 4) heeft deze verklaring gezocht in quantitatieve verschillen. Hij heeft nauwkeurig de omzetting der „suikers” langs chemischen weg bepaald en vond dat ze nu eens meer dan minder suiker splitsen, maar altijd wat. Ook de SHIGA-KRUSE-bacillen tasten maltose aan. In verband met latere uiteenzetting is het belangrijk dat WINTER zijn maltose van de firma KAHLBAUM betrok, omdat hij in die van andere firma's vaak gist kon aantoonen.

1) Zie LENTZ l. c.

2) The Journal of Hygiene. Vol. XI, No. 1. 1911.

3) Centralblatt für Bakteriologie, Abt. I, Or. Bd. 78, H. 1. 1916.

4) Zeitschrift für Hygiene und Inf. Bd. 70, blz. 273. 1912.

De verklaring van WINTER heeft het vraagstuk niet afdoende opgelost. Want ook al waren het slechts quantitatieve verschillen, dan nog blijft de vraag bestaan: Waarom zet ééNZelfde cultuur van atoxische dysenterie-bacillen nu eens veel maltose om en dan weer zoo weinig dat de reactie tegenover lakmoes niet verandert?

Twee antwoorden zijn m.i. daarop mogelijk. Ten eerste kan het zijn een variabiliteit der atoxische dysenterie-bacillen. Deze variabiliteit kan berusten op uitwendige oorzaken (voeding enz.) of op oorzaken die zich aan onze waarneming onttrekken: veranderingen in het lichaam der bacillen zelven.

Ten tweede kan men zich denken dat wij bij de atoxische dysenterie-bacillen niet te doen hebben met zuivere stammen, maar met mengsels, ongeveer in den zin der „populaties” van JOHANNSEN. En aan de uitwendige omstandigheden zou het dan te danken zijn welk deel der populatie de overhand heeft, en zijn stempel drukt op onze reacties.

Beide mogelijkheden brengen ons in aanraking met het vraagstuk der variabiliteit, waarvoor ik, ter inleiding van den uitslag mijner eigen proefnemingen, in het volgende hoofdstuk kortelijk de aandacht vraag.

HOOFDSTUK III.

ALGEMEENE OPMERKINGEN OVER VERANDERLIJKHEID BIJ BACTERIEN.

Variabiliteit en erfelijkheid zijn natuurverschijnselen, aanvankelijk slechts bij hoogere levensvormen, die zich door amphimixis vermenigvuldigen, bestudeerd.

Aangezien bacteriën asexueel zijn, is het te begrijpen dat namen en begrippen voor de variabiliteit der eerstgenoemden gekozen zonder meer niet op de anderen zijn toe te passen.

Toch heeft men zich in de bacteriologie trachten aan te passen aan namen en denkbeelden, die reeds gevormd waren bij de studie der hoogere organismen, en in het bijzonder heeft men van de mutatietheorie van HUGO DE VRIES voor de rangschikking en het begrip van de veranderlijkheid der bacteriën groote verwachtingen gekoesterd.

DE VRIES heeft in zijn laatste les aan de Universiteit van Amsterdam (13 Juni 1918) nog eens een beknopt overzicht gegeven van het erfelijkheidsvraagstuk en de door hem daarbij ingevoerde begrippen en namen.

De erfelijkheid verbindt DE VRIES aan kerndeeltjes door hem ter eere van de pangenesis-theorie van DARWIN *pangen* genoemd, in de literatuur meer bekend onder de afkorting *genen*.

Deze genen bepalen vorm, groei en uiterlijk van het individu. Naarmate de één of andere gene of

genencombinatie haar invloed meer of minder doet gelden op den groei en de vorming van het individu, ontstaan er schommelende variaties, fluctuaties genoemd. „Het is het beginsel dat bedoeld wordt als men zegt, dat geen twee bladeren van een boom precies aan elkaar gelijk zijn”.

Tegenover fluctuatie staat mutatie, de sprongsgewijze variatie.

Komt bij het aantal genen een nieuwe gene, dan spreekt DE VRIES van progressieve mutatie. Deze mutatie uit zich dan in een nieuwe eigenschap die het individu heeft verworven. En deze nieuwe eigenschap is erfelijk in tegenstelling met de verschillen onder fluctuatie saamgevat, die slechts *asexueel* (door stekken, enten enz.) echter niet *sexueel* geërfd worden.

Naast de progressieve mutatie kent DE VRIES nog regressieve en degressieve mutatie. Zij berusten op het inactief of weer actief worden van een gene. Komt een eigenschap die een der voorouders bezat weer voor den dag (atavisme), dan berust dit niet op het optreden van een nieuwe gene, maar op het weer actief worden van een aanwezige inactieve gene. Dit proces heet degressieve mutatie. En bij het te loor gaan van een eigenschap denkt men niet aan het verlies van een gene, maar naar analogie met atavisme aan het inactief worden van een gene. Het wordt daarom genoemd verlies-mutatie of regressieve mutatie.

Deze terminologie wordt door de bacteriologen op verschillende wijze overgenomen, wat met het oog op de verschillen tusschen de voortplanting van bacterien en hoogere organismen begrijpelijk is.

Maar bovendien staan vele bacteriologen aan de zijde van de tegenstanders van DE VRIES, die niet aan

een progressieve mutatie, waarbij nieuwe genen optreden, gelooven.

Voor ik hiervan een enkel voorbeeld geef is de vraag gewettigd: Welke is de beteekenis van de studie der veranderlijkheid voor de kennis der bacterien? En omgekeerd, welke beteekenis heeft de bestudeering der bacterien voor de bestudeering van het variabiliteitsvraagstuk in het algemeen? Op beide vragen moet geantwoord worden: die beteekenis is ongemeen groot. Vooral moet men het voordeel erkennen van de bestudeering van het ontstaan van „nieuwe soorten” bij bacterien. De uitslag der proeven van DE VRIES over *Oenothera* is gewraakt als te berusten op bastaardeering. Dit bezwaar is bij de asexueel zich voortplantende bacterien uitgesloten. De erfelijkheid bij bacterien kan zonder moeite in vele generaties worden vastgesteld. Uitwendige omstandigheden zijn op allerlei manier te controleeren en te veranderen. „Reine Linien”, juister „Klonen”, zijn gemakkelijk te verkrijgen. Zelfs is het niet moeilijk om van één enkel individu uit te gaan.

Maar de moeilijkheden zijn ook vele. Wat is één generatie bij bacterien? Is er een afzonderlijk soma en kiemplasma? Treft elke prikkel soma en kiemplasma (als die gescheiden zijn) beiden? Zoo zijn er vele vragen.

Moeilijker is het antwoord op de tweede vraag: wat is de waarde der variabiliteit voor de bacteriologie? Want deze wordt bepaald door de denkbeelden der bacteriologen over variatie. En die zijn heel verschillend.

Daar zijn er die gelooven dat variatie bij de ongeslachtelijke wezens iets heel anders is dan bij de

hoogere geslachtelijke. Van hen noem ik PRINGSHEIM, die het begrip mutatie in de bacteriologie onbestaanbaar acht, omdat het volgens den inhoud ervan slechts toepasselijk is op geslachtelijke organismen. 1)

PRINGSHEIM 2) rekent de meeste verschijnselen van veranderlijkheid van bacterien tot adaptatie. Allerlei wat anderen voorstellen als mutatie acht PRINGSHEIM een eenvoudige aanpassing. Ook b.v. de vorming van roode knopjes op de Endo-platen bij *B. coli mutabile*, een soort die eerst bleek groeit op Endo-platen (de lactose dus niet omzet) en pas den derden dag in vele witte kolonies roode knopjes te zien geeft, die bij uitzaaien steeds weer roode kolonies leveren. Daar PRINGSHEIM dit als adaptatie (Reizauslösung) beschouwt, komt hij met de meeste bacteriologen ook tot de erfelijkheid van verworven eigenschappen bij bacterien in tegenstelling met hetgeen bij hoogere levende wezens vaststaat.

JENSEN 3) heeft dit aldus uitgelegd: bei niederen Organismen (kommt) im allgemeinen wohl eine Vererbung erworbener Eigenschaften zur Geltung da hier das den Einwirkungen der Aussenwelt ausgesetzte Soma selbst die Substanz darstellt, aus der die Körper der Nachkommen gebildet werden; in tegenstelling dus met de hoogere organismen, waar kiemcellen en somacellen gescheiden zijn en de inwerking der buitenwereld alleen het soma betreft.

Adaptaties die niet op het nageslacht overgaan noemt PRINGSHEIM modificaties.

1) Zie hierover ook Ernst Lehmann. Centralblatt für Bakteriologie. Abt. I, Or. Bd. 77. H. 4. 1916.

2) H. PRINGSHEIM. Die Variabilität niederer Organismen. Eine descendenztheoretische Studie. Berlin 1910.

3) cit. van EISENBERG. WEICHARDT's Ergebnisse der Hygiene 1914.

Tegenover deze functioneele aanpassing stelt PRINGSHEIM de fluctuaties. Dat zijn variaties uit inwendige onbekende oorzaken. Deze variaties blijken gewoonlijk bij selectieproeven niet erfelijk. Als voorbeeld van het tegendeel noemt men wel de asporogene rassen die door selectie uit gewoonlijk sporenvormende soorten zijn gekweekt.

BEYERINCK 1) spreekt van modificatie, fluctuatie en mutatie.

Modificatie is de niet erfelijke adaptatie. Dus het vertoonen van nieuwe eigenschappen onder andere levensomstandigheden, die onder de oude voorwaarden van groei weer verdwijnen (juist dus als PRINGSHEIM). Fluctuatie is elke variatie door uitwendige omstandigheden die wel erfelijk is. En mutatie: dezelfde soort van variatie met grootere sprongen, minder onder invloed der uitwendige omstandigheden terwijl „die in relativ wenigen Individuen eines Stammes realisierten Innenbedingungen Hauptfaktoren der Veränderung sind. Evenwel: Dennoch ist für mehrere Mikrobenmutationen sicher nachgewiesen, das ein von aussen herkommender Reiz notwendig ist um die Mutation auszulösen. . . . Daraus geht hervor das auch in dieser Beziehung eine scharfe Grenze zwischen Fluktuation und Mutation nicht besteht. En BEYERINCK kent vele mutaties. Al vindt hij de meeste mutaties verliesmutaties. En juist omdat het meest gaat om het latent worden van een eigenschap of het manifest worden van een latente eigenschap (atavisme), acht hij de mutatie voor het ontstaan van nieuwe soorten voorloopig niet van groot belang.

1) Folia microbiologica 1912.

Wat nu de theorie betreft waar deze termen het stellingwerk van vormen: Die Genen oder Erbeinheiten sind die Träger der sichtbaren Eigenschaften und können am besten als Teile des Protoplasmas oder des Zellkernes gedacht werden. Sie kommen in zwei Zuständen in den Zellen vor, nämlich als aktive Genen, welche die äusserlich wahrnehmbaren Merkmale verursachen, und als schlummerende oder Progenen, welche den Erscheinungen der Mutabilität und des Atavismus zugrunde liegen, indem sie dabei in aktive Genen übergehen. Dass wahrhaft neue Genen bei der Mutation jemals gebildet werden ist nicht erwiesen.

EISENBERG 1) sluit zich in zijne theorie bij de voorstellingen van JOHANNSEN aan. Hij spreekt van een phänotypus en genotypus. De phänotypus is de som der eigenschappen zooals wij die kunnen waarnemen; de genotypus is de „Anlagentypus, die platonische Idee der Art“, dus de som van alle mogelijke eigenschappen. Door experimenteele verandering van milieu kan men mogelijk sluimerende genen van den genotypus actief maken en zoo den phänotypus veranderen.

Ook EISENBERG noemt modificatie de niet erfelijke variatie door milieuverandering. Ook neemt hij mutatie door uitwendige prikkels aan. In tegenstelling met BEYERINCK ziet EISENBERG in de genenhypothese voor de mikrobiologie in het algemeen geen voordeel.

Op één punt acht hij deze hypothese eenigermate gerechtvaardigd, namelijk als het gaat over de vraag of „etwas für die betreffende Spezies phylogenetisch Neues“ ontstaat of ontstaan kan. En tegenover deze vraag staat EISENBERG principieel wel hetzelfde als

1) W. WEICHARDT. Ergebnisse der Hygiene und Bakteriologie, 1914.

BEYERINCK, maar practisch gaat hij verder: „Und auch wenn man zugibt, dass äussere Reize aus einem Lebewesen nichts anderes herausbringen können, als was ihm in potentia gegeben war, braucht die Vergangenheit einer Art doch nicht alle möglichen Reaktionen an ihr ausgelöst haben und es können quantitativ oder qualitativ oder kombinatorisch neue Reize etwas auslösen, was konstitutionell wohl möglich aber doch empirisch noch nicht dagewesen ist. Angaben wie die von R. MÜLLER über die Entstehung von Paratyphus aus Typhus oder von SOBERNHEIM und SELIGMANN über die Spaltungen des HAUSTEDT-Stammes wird man schon wegen ihrer Seltenheit mit aller nötigen Reserve aufnehmen, darüber hinweggehen können wir aber nicht mehr. Es sei zugegeben, dass die bisherigen Erfahrungen über das Rätsel der Artentstehung uns noch sehr wenig sagen können. Aber hier scheint vorläufig in der Mutation die einzige Aussicht auf eine zukünftige Lösung des Problems sich zu eröffnen”.

Zoo gaat EISENBERG dus practisch veel verder, als hij gelooft dat de mutatie instaat is theorieën van MÜLLER en SELIGMANN te rechtvaardigen. Hoe ver SELIGMANN met zijn evolutiedenkbeelden al gaat hebben wij vroeger reeds vermeld.

K. BAERTHLEIN gaat in zijn latere geschriften nog verder. In het Centralblatt für Bakt., Bd. 81 H. 6. 1918 schrijft hij: „Die bakterielle Variation kann aber noch weiter gehen und die Artgrenzen überspringen und Brücken von einer Bakterienart zur anderen, ihr im System am nächsten stehenden schlagen... auf der anderen Seite werden bisher als selbstständig geltende, nahe verwandte Bakterienarten in Varietäten oder

Unterarten einer einzigen, nunmehr weiter zu begrenzenden Art umgewandelt”.

Zoo heb ik dus door bovenstaande vier voorbeelden trachten weer te geven welke meeningen over variabiliteit bij bacterien door de verschillende onderzoekers worden gehuldigd. En de anderen schakeeren zich op allerlei wijze daartusschen.

Uit bovenstaande blijkt wel duidelijk dat we hier te doen hebben met een zich nog ontwikkelende tak van wetenschap. HUGO DE VRIES drukte zich op 13 Juni van dit jaar aldus uit: „Het spreekt van zelf, dat men binnen een paar tientallen van jaren geen oplossing mocht verwachten. Maar op den weg, die eenmaal tot het doel moet leiden, zijn nu reeds een schat van ontdekkingen van groot belang gedaan. De leer der erfelijkheid, die toen een vergelijkende wetenschap was, is van dit oude kleed ontdaan en een geheel nieuwe phase ingetreden. Ons inzicht in de natuur van het leven is dieper en veelzijdiger geworden”.

Als zoo gesproken wordt door een der eerste onderzoekers op het gebied der variabiliteit bij hoogere planten, is het te begrijpen dat we niettegenstaande den schat van ontdekkingen ook bij bacterien hier nog lang niet op vasten bodem staan.

* * *

In het voorgaande heb ik mij kort met de algemeene zijden van het vraagstuk der veranderlijkheid van bacterien beziggehouden. Thans nog een enkel woord over de bijzondere beteekenis er van binnen het gebied der pathologische bacteriologie.

Vergelijkt men de ziektekiemen onderling met betrekking tot verschillende eigenschappen, zooals hun vermogen zich in de buitenwereld staande te houden, hun standvastigheid ziekte te veroorzaken enz., dan treedt wel duidelijk aan den dag hoe het parasitaire karakter van het eene mikro-organisme veel scherper omlijnd is dan dat van het andere. Als uitersten kan men de syphilisspirochaeten en den colibacil noemen, de eerste een typische parasiet, de laatste een commensaal, die alleen onder bijzondere voorwaarden parasitaire eigenschappen ontvouwt. Maar ook tusschen meer verwante organismen kan men zulk een onderscheid erkennen. De typhusbacil staat in den typhuscoligroep als parasiet aan de eene zijde, de colibacil als commensaal aan de andere zijde, terwijl de paratyphusbacillen zich deels meer naast den typhusbacil, deels meer naast den colibacil groepeeren.

Er is reden om aan te nemen dat het strikt parasitaire karakter van sommigen eenerzijds en het facultatief-parasitaire karakter van velen anderzijds samenhangen met een grootere of geringe stabiliteit van eigenschappen, die het vermogen tot functioneele aanpassing bepaalt. Ook binnen de groep der dysenteriebacillen komt deze beschouwingswijze¹⁾ in aanmerking, waar het duidelijk afgeteekende karakter van den strikt parasitair SHIGA-KRUSE bacil een scherp contrast vormt met de vage beelden der vele andere dysenteriebacillen, wier parasitair vermogen gemiddeld niet

1) Deze beschouwingswijze, die ik heb leeren kennen bij het onderwijs in bacteriologie in het Instituut voor Tropische Hygiëne, vindt men o.a. reeds kort aangeduid in Prof. VAN LOGHEM's artikel: Het grensgebied van Commensalisme en Parasitisme. Ned. Tijdschrift voor Geneeskunde, 1917, I, 13.

slechts achterstaat bij dat van den eerstgenoemde, doch zich bovendien uiterst wisselend voordoet. Zoo rijst dan de vraag, of de toenemende veelheid der atoxische dysenteriebacillen, die met nieuwe bacteriologische ervaringen, aan telkens nieuw gestelde grenzen blijft ontsnappen, wellicht een schijnbare is tengevolge der veranderlijkheid van eene enkele of van slechts weinige soorten.

De in de volgende bladzijden vermelde proefnemingen zijn genomen om tot de beantwoording van deze vraag iets bij te dragen.

HOOFDSTUK IV.

DE HERKOMST VAN HET MATERIAAL VAN ONDERZOEK.

In 1915 en 1916 heeft Dr. F. H. HEHEWERTH 1) in het Centraal Laboratorium voor de Volksgezondheid te Utrecht een aantal dysenterie-stammen op hun morphologie en algemeene reacties, maar bijzonderlijk op hun „suiker”-reacties en gedrag bij agglutinatieproeven onderzocht. Het doel was na te gaan of de „suiker”-reacties of de agglutinatie of beide in verbinding met elkaar een constant onderscheidingsmiddel vormden. De conclusie door HEHEWERTH uit zijn zorgvuldige en belangwekkende onderzoekingen getrokken is hierboven al medegedeeld.

In November 1917 heb ik door de welwillende bemiddeling van Dr. CHR. WINCKEL van den directeur van het Centraal Laboratorium Dr. BROERS, wien ik hier mijn oprechten dank betuig, uit zijn laboratorium een aantal dezer stammen voor mijn onderzoek mogen ontvangen.

Prof. v. LOGHEM voegde aan de reeds uit Utrecht ontvangen stammen nog een zestal, deels door hem in Deli geïsoleerd toe. Totaal is er dus gewerkt met de volgende stammen: 74b, 77b, 78a, 78b, 88a, Aalten, Groningen, SHIGA-KRUSE (SPRONCK), FLEXNER (SPRONCK),

1) Centralblatt für Bakteriologie. Abt. I. Or., Bd. 78, H. 1. 1916.

FLEXNER (KRAL), STRONG (SPRONCK), HISS-RUSSEL (SPRONCK), Deli A. KIM, Deli KOKKI V.R., BEUKERS, Deli KASTELEIJN, Deli 2396, Deli X 2012. De zes laatstgenoemde zijn van Prof. v. LOGHEM en zullen voortaan worden aangeduid met D. A. KIM, enz.

De andere zijn uit Utrecht. Daarvan zijn de stammen 74b, 77b, 78a, 78b, afkomstig van een epidemie in het interneeringskamp te Zeist in Augustus en September 1915. 88a is van een particuliere patient uit Utrecht.

Aalten is een geval van pseudo-dysenterie aldaar, Groningen is te danken aan de infectie van een laborant met een SHIGA-KRUSE laboratorium-stam. De SHIGA-KRUSE, FLEXNER, STRONG en HISS-RUSSEL met den naam SPRONCK tusschen haakjes er achter zijn stammen reeds veel vroeger geïsoleerd door Prof. SPRONCK, dus oude laboratoriumstammen. FLEXNER (KRAL) is afkomstig uit het „Museum” te Weenen.

HOOFDSTUK V.

VERANDERLIJKHEID IN DE SPLITSING VAN KOOLHYDRATEN DOOR ATOXISCHE DYSEN- TERIE-BACILLEN, ONDERZOCHT OP KUNST- MATIGE VOEDINGSBODEMS.

Alle stammen werden voor het onderzoek eerst nagezien op hun morphologische eigenschappen. LENTZ 1) zegt dat vorming van draden in de culturen weinig voorkomt, alleen als een stam wordt gekweekt op een ongeschikte voedingsbodem. HEHEWERTH vond bij stam 88a al dadelijk ook op gunstige voedingsbodems (Endo-agar) draadvorming. BAERTHLEIN 2) liet een agarbuisje met cultuur drie weken aan zijn lot over, en entte daarna op agarplaten. Hierop kwamen nu twee koloniesoorten: één met zeer veel draadvorming en de ander met korte dikke staafjes. Deze mutanten (volgens BAERTHLEIN) bleven constant bij voortkweken en vertoonden vaak terugslag, als ze weer drie weken op een agarbuisje aan hun lot werden overgelaten.

Bij het maken van de Gram-praeparaten (die alle negatief waren) vielen mij dadelijk stam FLEXNER (SPRONCK) en BEUKERS wegens het groote aantal draadvormen op. Bijna geen staafjes en zeer veel draden. Verder hadden de stam SHIGA-KRUSE, STRONG, HISS-

1) l. c. in W. KOLLE en A. v. WASSERMANN.

2) Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte. Bd. 40. Sept. 1912.

RUSSEL en Groningen naast veel staafjes ook een matig aantal draadvormen. Het geldt hier oudere laboratoriumstammen, dus bevestigt BAERTHLEIN's vondst. Stam 88a die dadelijk na de isolatie veel draadvormen gaf, bleef bij mij uit enkel staafjes bestaan. Dit zou dus een terugslag zijn.

Ik heb evenals BAERTHLEIN verschillende stammen drie en meer weken bewaard bij verschillende constante en wisselende temperatuur (22° C., 37° C., 8° C. en de wisselende kamertemperatuur). Ook nu waren er verscheidene stammen die na drie weken draadvormen gaven, zooals 74b en 78b. Echter bleken deze niet altijd constant, want latere praeparaten vertoonden ze vaak niet. Verder waren er onder de verschillende culturen allerlei staafvormen.

Van alle stammen werd zoo nu en dan ter controle onderzocht de onbeweeglijkheid, het niet vervloeien van gelatine, het niet reduceeren van neutraalrood (OLDEKOP), het onvermogen om gas uit glucose te vormen en de licht roode verkleuring van den lakmoesvoedingsbodem van SEITZ, waarbij deze helder blijft. Al deze eigenschappen bleven constant.

Het onderzoek van het niet zuur vormen uit lactose en wel uit glucose werd meestal gelijktijdig gedaan met het onderzoek op de verdere reeks van het schema van LENTZ: manniet, maltose, saccharose.

Voor dit onderzoek heb ik mij altijd bediend van de volgende vloeistof:

Pepton	1 %
Na Cl	0,5 „
Lakmoestinctuur.	5,5 „
Koolhydraat	1 „

Dit wordt een uur bij 100° C. gesteriliseerd.

Deze voedingsbodem, het eerst door de Japanners aangegeven, heeft vele voordeelen boven andere voedingsbodems voor het suikeronderzoek in gebruik. In Duitschland wordt b.v. veel gebruikt de vloeistof van BARSIEKOW-HETSCH. Deze bevat in plaats van 1 % pepton, 1 % nutrose. Het nadeel hiervan is dat als men met deze vloeistof de maltose-oplossing klaar maakt, SHIGA-KRUSE zeer vaak, maar ook STRONG en Y zoo nu en dan het maltosebuisje na tweemaal 24 uur licht rood kleuren. En daar het bij de onderscheiding van FLEXNER ten opzichte van de zoo juist genoemde bacillen op de maltoseomzetting aankomt, lijkt mij dit een groot bezwaar. Ook al beweert men dat deze lichtroode tint goed te onderscheiden is van een echte omzetting door een FLEXNER-bacil.

VAN LOGHEM (Gen. Tijdschrift voor Ned.-Indië 1909, blz. 20) veronderstelt, dat bij het steriliseeren bij aanwezigheid der nutroseoplossing, die zuur reageert, de hoogere suikers gesplitst worden en uit deze invert-suikers de SHIGA-KRUSE-bacil zuur kan vormen.

Naast deze vloeibare voedingsbodems heeft men de vaste, met agar samengesteld. Deze zijn het meest gebruikt. LENTZ, KRUSE, HISS, RUSSEL en vele andere onderzoekers hebben op deze vaste suikervoedingsbodems onderzocht. Het meest in gebruik is de Drigalski-Conradi-voedingsbodem 1), of ook wordt genomen de Endo-voedingsbodem waarvan de lactose vervangen wordt door de te onderzoeken „suiker”. Ten slotte het eenvoudigst: gewone voedingsagar met toevoeging van 10 % lakmoestinktuur en 2 % suiker.

Deze vaste voedingsbodem wordt op twee wijzen gebruikt, namelijk in gewone agarbuisjes en als platen

1) Zonder kristalviolet, daar deze stof de groei remt.

in Petrischalen. Geen van beide methoden heeft mij voldaan. De plaatmethode heb ik een poos toegepast om daarmee verschillende stammen uit één cultuur uit elkaar te halen. Hiervoor heb ik met een ent-naald met wat cultuur er aan fijne strepen op de plaat getrokken. Op deze strepen ziet men op de Endoplaat na éénmaal 24 uur naast elkaar bleeke en roode kolonies. Na nog eens 24 uur zijn vele bleeke kolonies rood geworden en wacht men nog maar eens 24 uur dan zijn de meeste rood. Heeft men een zuivere FLEXNERstam geënt, dan krijgt men vrijwel hetzelfde te zien in mindere mate. Hier is na tweemaal 24 uur alles rood. Maar het is duidelijk dat men hierbij geen vastheid heeft. Ent men namelijk na 24 uur bleeke kolonies af, dan vindt men vaak dat ze op de volgende plaat uitgezaaid reeds na eenmaal 24 uur rood zijn. Ook later te vermelden controle met eencelkolonies bewees mij de onvoldoende zekerheid van deze plaatmethode. Als men echter verschillende stammen naast elkaar uitstreept, kan men voldoende de soorten onderscheiden, maar als het op fijnere differentieering aankomt, schiet de plaatmethode te kort.

De buisjesmethode o. a. door KRUSE c.s. in zijn uitgebreid onderzoek gebezigd heeft ook bezwaren. Bij de steekcultuur immers kan na tweemaal 24 uur een gedeelte rood en een gedeelte kleurloos zijn (al naar den indicator). KRUSE beoordeelde het resultaat van zijn buisjes soms na eenmaal 24 uur maar vaak ook na zevenmaal 24 uur, tot tienmaal 24 uur toe. Dan kan het resultaat niet „eindeutig” zijn.

Ten slotte is er nog een euvel de vasten voedingsbodems aanklevend, dat de vloeibare missen. Heeft

men namelijk een maltose omzettende kolonie en daarnaast een bleeke, dan krijgt zeer vaak de bleeke een roode tint als de roode kolonie maar tijd van groeien heeft. De maltose wordt verder in den omtrek van de kolonie omgezet dan de macroscopische of microscopische uitbreiding van de kolonie.

De vloeibare voedingsbodem is m.i. de beste. Alleen weten wij dat, als er in het oogje met cultuur dat wij in de vloeistof brengen enkele omzetters van de betreffende suiker zijn, de heele vloeistof rood gekleurd wordt. Hoeveel dit kan lijden zullen wij later zien.

In het begin werd altijd 7 c.c. vloeistof in gewone reageerbuisjes gedaan. Later minderde dit tot 5 c.c. Toen de nood aan materiaal erg begon te nijpen werden er agglutinatiebuisjes gebruikt ($\frac{1}{2}$ c.M. diameter en 8 c.M. hoogte), waar één c.c. een voldoende vloestofzuil in geeft. Ze zijn zeer handig, makkelijk in rekjes te plaatsen en voldoende.

Nu nog iets over de grondstoffen en de reactie.

De pepton van den voedingsbodem moet zoo zuiver mogelijk zijn. Het liefst gebruikt men pepton WITTE. Deze was echter zeer schaarsch en daarom heb ik meest pepton CORNELIS en Engelsche pepton gebruikt, die ook voor de indolreactie zeer geschikt bleken.

De „suikers” eischen ook vermelding wat hun herkomst betreft. Reeds BARBER en KUENEN 1) hebben er op gewezen dat de maltose van de firma KAHLBAUM vrij veel glucose bevat. Het best zijn de suikers van de firma MERCK. Misschien kan dit ook verklaren waarom WINTER, die de suikers van eerstgenoemde firma gebruikte, altijd splitsingsproducten vond en van quantitatieve verhoudingen spreekt.

1) Gen. Tijdschrift voor Ned.-Indië, 1915.

Gedeeltelijk heb ik suikers van de firma Mærck gehad, gedeeltelijk suikers van de Pharmac. Handelsvereniging betrokken, die uitstekend bleken te zijn. Staan de suikeroplossingen veertien dagen tot drie weken dan is het beter ze niet meer te gebruiken.

Als indicator heb ik lakmoestinktuur gehad. Men gebruikt soms veel meer indicators, ook in één onderzoek. Dit lijkt mij niet nuttig of noodig. Andere onderzoekers gebruikten b.v. chinablauw, terwijl men daar nog wel bijdoet safranine (bij manniet) of chrysoidine (bij maltose). Ook malachitgrün wordt gebruikt (LÖFFLER).

Wat betreft de reactie: alle dysenteriebacteriën tasten pepton aan en vormen hieruit alkalische afbraakresten in de vloeistof. En de kleuromslag wordt bewerkt door de zure splitsingscomponent van de „suiker”. Dus deze wordt altijd gedeeltelijk geneutraliseerd. POTTEVIN 1) schrijft b.v. dat SHIGA-KRUSE ook manniet aantast, maar dat dit niet duidelijk wordt door de alkalische producten van de pepton. Daarbij komt nog de factor van de aviditeit. LENTZ 2) zegt dat bacillen, pas uit den mensch geïsoleerd, meer aviditeit voor pepton dan voor suiker hebben. SHIGA isoleerde b.v. een bacil die eerst het mannietbuisje rood kleurde door pepton-afbraakproducten en later blauw (chinablauw als indicator). SHIGA had te weinig suiker genomen. Neemt men 1 % suiker dan heeft men hier volgens LENTZ geen hinder van.

Het resultaat werd beoordeeld na éénmaal 24 uur en na driemaal 24 uur. Beide uitkomsten werden voortdurend opgeteekend.

1) Zie LENTZ l. c. in KOLLE en WASSERMANN.

2) Ibidem.

De hierneven staande tabel bevat de gegevens van Dr. HEHEWERTH (1915—1916), Prof. VAN LOGHEM (1910—1914) en mijn latere onderzoekingen.

Van stam STRONG vermeldt HEHEWERTH reeds dat ze saccharose niet meer omzette en ook tijdens mijn onderzoek heeft zij dat nooit gedaan.

Van HEHEWERTH heb ik vijf stammen 78 vermeld, hoewel ik zelf maar 78a en b heb onderzocht, omdat hij hiervan schrijft, dat ze van één patient op verschillende dagen gekweekt zijn. Deze vijf stammen geven wel een typisch beeld uit het onderzoek van HEHEWERTH. Zeer grillig verlopen hun reacties. 78a is tijdens zijn onderzoek een zuivere Y, b eerst een Y daarna een FLEXNER, 78c is eerst een STRONG, later een Y, 78d een FLEXNER en 78e eerst een Y en later weer een FLEXNER. Zooals uit mijn voortgezet onderzoek blijkt is 78a eerst een FLEXNER geworden en later weer een Y. 78b is FLEXNER gebleven hoewel hij op 't laatst weifelt en na éénmaal 24 uur $\pm$ is om na driemaal 24 uur pas volkomen + te zijn. HEHEWERTH onthoudt zich van verdere opmerkingen of onderzoekingen naar aanleiding van dit eigenaardige gedrag. Hij vermeld alleen dat ook LÖSENER en EBELING en anderen bij een epidemie stammen hebben geïsoleerd die zich t.o.v. de suikers ongelijk gedroegen.

Behalve de vijf stammen 78 vertoont ook 88a reeds bij HEHEWERTH een omslag van Y naar FLEXNER. Behalve deze treft men in de tabel, wat de maltose betreft, nog een viertal omslagen aan tusschen 14 December 1917 en 24 Januari 1918 tegen slechts twee omslagen tusschen November 1917 en December 1917.

Bij HEHEWERTH heeft men meest den omslag liggen tusschen het onderzoek aanstonds na isolatie en het

onderzoek na $2\frac{1}{2}$ maand. Bij verder onderzoek veranderen de uitkomsten in zijn tabel niet meer. Mijn omslagen zijn dus van een eenigszins ander karakter en het betrekkelijk groot aantal omslagen op 24 Januari 1918 schrijf ik toe aan het blijven staan der culturen gedurende de Kerstvacantie. In deze vakantie zijn de agarculturen alleen beschermd tegen licht, maar blootgesteld geweest aan de gewone wisselende kamertemperatuur.

Deze veronderstelling gaf me aanleiding tot een gelijksoortige proef als die van BAERTHLEIN. Reeds eerder zijn deze vermeld 1). Maar BAERTHLEIN heeft nooit gelijktijdig met zijn twee soorten kolonies verschillen in de suiker-reactie gevonden. Beide soorten kolonies gaven dezelfde suikerreacties.

Omdat het in de Kerstvacantie koud geweest was, werd eerst een proef genomen in de ijskast, temp. 8°C . Hieraan werden in Februari en Maart 1918 4 agar-culturen van den SHIGA-KRUSE, FLEXNER (KRAL), STRONG en HISS-RUSSEL stam en 77b, 78a, 78b en 88a onderworpen. De eerste drie meer als controle, de laatste vijf wegens hun variabiliteit. Zij werden in een gesloten flesch in papier gepakt, dus van licht afgesloten in de ijskast geplaatst zonder verdere voorzorgen. Na 9, 17, 28, 30 en 38 dagen werd telkens een buisje van de culturen afgenomen en geënt op de vijf suikers: lactose, glucose, manniet, maltose en saccharose. Geenerlei omslag werd opgemerkt. Stam SHIGA-KRUSE was na 28 dagen reeds bezwaken. Na 38 dagen had ook stam HISS-RUSSEL het opgegeven en nu werden de culturen niet meer nagezien, omdat zelfs na ruim vijf weken geen omslag was waar te nemen.

1) Bladz. 31.

Op 20 Maart werd de proef herhaald maar nu met andere temperaturen en met bouillonculturen naast de agarculturen. Immers kon het naast den duur van het verblijf ook aan de temp. en de aard van den voedingsbodem liggen. Alle stammen n.l. SHIGA-KRUSE, FLEXNER, FLEXNER (KRAL), STRONG, HISS-RUSSEL, 74b, 77b, 78a, 78b en 88a met D. A. KIM werden tweemaal geënt in bouillon en op schuine agar, 20 uur bij 37° C. gelaten en nu werden alle buisjes om verdamping bij deze hoogere temp. te voorkomen toegesmolten met paraffine. De helft kwam in een dichte pot, tegen

TABEL II.

	Lactose.		Glucose.		Manniet.		Maltose.		Saccharose	
	24 uur.	72 uur.	24 uur.	72 uur.	24 uur.	72 uur.	24 uur.	72 uur.	24 uur.	72 uur.
77b.	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
77b. ag. 37° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
77b. bo. 37° C.	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
77b. ag. 22° C.	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
77b. bo. 22° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
78a.	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
78a. ag. 37° C.	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
78a. bo. 37° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
78a. ag. 22° C.	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
78a. bo. 22° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
78b.	—	—	+	+	+	+	±	+	—	—
78b. ag. 37° C.	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
78b. bo. 37° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
78b. ag. 22° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
78b. bo. 22° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
88a.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
88a. ag. 37° C.	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
88a. bo. 37° C.	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
1) 88a. ag. 22° C.	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
88a. bo. 22° C.	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—

— is negatief, ± zwak positief, + positief.

1) Stam 88a. ag. 22° C. bleek afgestorven.

licht beschermd, in de 22° C. stoof en de andere helft in de 37° C. stoof. Na 26 tot 28 dagen werden al deze stammen nagekeken en weer beoordeeld na één- en driemaal 24-urige groei bij 37° C. in de „suikers”.

Ook nu reeds waren enkele stammen dood en wel de agarculturen van FLEXNER (KRAL) en HISS-RUSSEL uit de 37° C. stoof en de agarcultuur van 88a uit de 22° C. stoof.

De stammen SHIGA-KRUSE tot en met 74b en D. A. KIM gaven ook na ongeveer vier weken dezelfde „suiker”-reacties als tevoren. Bij 77b, 78a, 78b, 88a kwamen echter enkele geringe verschillen, die het vermelden waard en in tabel 2 weergegeven zijn.

Zooals wij zien gaat het bij 77b en 78a om stammen die een niet twijfelachtige reactie in maltose gaven. Beide zijn na één- zoowel als na driemaal 24 uur negatief. 78b en 88a zijn echter stammen die zelf al geen zekeren indruk maken; 78b is na 24 uur twijfelachtig en na 72 uur goed positief, 88a na 24 uur negatief en na 72 uur positief.

Van 77b zijn het de agarcultuur bij 37° C. en de bouilloncultuur bij 22° C. en van 78a de bouillonculturen, die na vier weken na 72 uur in maltose positief worden; bij 78b en 88a zijn de agarculturen bij 37° C. in de FLEXNER-richting verschoven, benevens de bouilloncultuur van 88a bij 22° C.

De verschillen zijn dus gering.

Het verder onderzoek geschiedde door uit elken stam een voldoende groot aantal ééncelculturen te maken.

Reeds voor ik deze proeven deed, probeerde ik de ééncelcultuurmethode; juist wegens de eigenaardige reactie in maltose-peptonwater, zooals bij 78b en 88a.

Hier immers ligt de gedachte voor de hand dat wij te doen hebben met een mengcultuur. En in deze mengcultuur kan door bovengenoemde proeven een verschuiving hebben plaats gevonden.

Eén van de eersten die een methode voor ééncel-culturen heeft gegeven is onze landgenoot S. L. SCHOUTEN 1). Hij heeft een handig apparaat gemaakt, dat, naast het microscoop geplaatst, gelegenheid geeft om door drie micrometerschroeven (in de drie ruimte-richtingen werkend) een fijne glasstaaf in alle richtingen te bewegen. Met deze glasstaaf boven op den toestel aangebracht kan men uit een hangenden druppel, onder het microscoop geplaatst, een spore van een schimmel overbrengen naar een daarnaast gelegen steriele voedingsdruppel, onder microscopische controle.

BARBER 2) heeft soortgelijk toestel bedacht en deelt mee van dysenteriebacillen hiermee in één uur ongeveer 50 enkele cellen te kunnen afzonderen.

Ik heb met een dergelijk toestel gewerkt. NIEUWENHUIS 3) heeft n.l. van den toestel van SCHOUTEN een verbeterde uitgave gegeven. De glasstaaf boven in den toestel trekt hij in een klein vlammetje tot een fijn draadje van ongeveer $10\ \mu$ uit. Hieraan smelt hij een bolletje van ongeveer $30\ \mu$ door het draadje even door het vlammetje te halen. Hij wil nu de bacterie of spore op het balletje uit den materiaaldruppel visschen en overbrengen in een voedingsdruppel die ten getale van vier of meer zich naast den materiaaldruppel bevinden.

1) Academisch proefschrift. Utrecht 1901.

2) The Philippine Journal of Science VIII. 1913.

3) Verslag van de gewone vergadering der wis- en natuurk. afd. van de Koninklijke Academie van Wetenschappen te Amsterdam. 1910.

Deze ingenieuze toestel is ook op het laboratorium van het Instituut aanwezig. Maar het lijkt mij geschikt voor sporen van schimmels, die in ieder geval een flinke afmeting hebben dan voor bacteriën. Het is mij na veel teleurstelling slechts een paar maal gelukt één enkele cel op te vissen en over te brengen, hetgeen voor mij, die over een groot aantal ééncel-culturen bij vele stammen wenschte te beschikken, de methode onbruikbaar maakte.

Na SCHOUTEN en BARBER is BURRI 1) gekomen met een eenvoudige en vernuftige methode. Hij benut den Oost-Indischen inkt. Deze (afkomstig van GÜNTHER-WAGNER) wordt ongeveer negenmaal verdund en nu wordt wat cultuur gedaan in een flinken druppel steriele, verdunde Oost-Indische inkt op een steriel voorwerpglas. Uit dezen materiaaldruppel wordt in daarnaast liggende druppeltjes met een platinaoogje wat uit den materiaaldruppel gebracht. Eerst in het naastbij liggende druppeltje. Uit dit weer in het daarnaast liggende. Zoo tot ongeveer vier of zes maal. Nu wordt met een fijn steriel schrijfpennetje wat uit het laatste druppeltje genomen en hiermee fijne stipjes gemaakt op een gelatineplaat. Na ongeveer een halve minuut wordt op de stipjes een dekglasje gelegd. Onder een dekglasje kunnen makkelijk zes maal zes dus ongeveer 36 stipjes komen. Met een sterk, droog stelsel wordt nauwkeurig nagezien welke stipjes maar één bacil bevatten. Dit is werkelijk goed te zien. Nu gaat na aantekening welke stipjes voldoen de plaat 24 uur in de broedstoof van 22° C. en wordt naar groei gekeken.

1) Das Tuscheverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwierigen Aufgaben der Bakterioskopie. Jena 1909.

De BURRI-methode voor ééncelculturen is een keurige methode. Makkelijk, eenvoudig en ook betrouwbaar, maar — de dysenteriebacillen groeiden niet. Ik wist reeds uit de literatuur dat de BURRI-methode niet ging met cholera, diphtherie en tetanus, maar ook bij dysenterie is het mij niet gelukt. Ik heb getracht den inkt sterker te verdunnen, met wat anders dan aqua dest. te verdunnen, korter of langer te kweeken — niets heeft mogen baten. Ook in stipjes waar meer bacillen lagen, was geen groei waar te nemen.

Tenslotte hield ik de oudste methode, de plaatmethode van KOCH over. En eigenlijk is dit de eenvoudigste methode, waarbij verreweg de meeste bacillen goed groeien.

HOLM heeft uitgebreide controles gedaan en uitvoerige berekeningen gemaakt en gevonden dat in het slechtste geval honderd kolonies gevormd worden door 135 bacillen en in het beste door 108 bacillen. Herhaalt men de uitzaaiing met één enkele kolonie acht maal, dan wordt de fout gemiddeld één op vijfhonderd millioen. BAERTHLEIN, SELIGMANN, EISENBERG, TRAUTMANN, DALE, SOBERNHEIM en anderen zijn er zeer tevreden over en werken altijd met de plaatmethode (EISENBERG; WEICHARDT's Ergebnisse der Hygiene etc. 1914).

Ik nam drie gelatinebuisjes, in een waterbad van 33° C. vervloeid. In het eerste werd ongeveer $\frac{1}{4}$ oogje cultuur geënt, in het tweede het vlies dat in een groot oogje blijft hangen uit het eerste buisje en in het derde tweemaal zoo'n vlies uit het tweede buisje. Van de buisjes werden platen gegoten en deze minstens tweemaal 24 uur bij 22° C. geplaatst. Dysenteriebacillen groeien langzaam op gelatine, zoodat vaak

eerst na tweemaal 24 uur voldoende groote kolonies opgekomen waren. Meestal was de derde, soms ook de tweede plaat bruikbaar. Microscopisch werd uit één plaat een 25-tal typische kolonies uitgezocht en met Oost-Indische inkt aangeteekend. Die kolonies werden daar uitgepikt, waar geen kleinere in de buurt waren te vinden, zoodat zoo goed mogelijk één enkele kolonie kon worden afgestoken. Deze kolonies werden nu in agglutinatiebuisjes met maltose-pepton-water geënt en na éénmaal en driemaal 24 uur nagezien.

Met deze methode van onderzoek zijn de volgende gegevens verkregen, en in den hieronderstaanden tabel vermeld.

TABEL III.

				Na 24 uur.	Na 72 uur.
20	kolonies	van	77b. in maltose	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	77b. ag. 37° C. " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	77b. bo. 37° C. " "	19 —, 1 +	19 —, 1 +
20	"	"	77b. ag. 22° C. " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	77b. bo. 22° C. " "	19 —, 1 +	19 —, 1 +
20	"	"	78a. " " " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	78a. ag. 37° C. " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	78a. bo. 37° C. " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	78a. ag. 22° C. " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	78a. bo. 22° C. " "	19 —, 1 +	19 —, 1 +
20	"	"	78b. " " " "	?	?
20	"	"	78b. ag. 37° C. " "	15 +, 5 —	17 +, 3 —
20	"	"	78b. bo. 37° C. " "	alle 20 —	alle 20 —
20	"	"	88a. " " " "	18 +, 2 —	18 +, 2 —
20	"	"	88a. ag. 37° C. " "	18 +, 2 —	18 +, 2 —
20	"	"	88a. bo. 37° C. " "	alle 20 —	alle 20 —

Een bevrediging schenkt dit resultaat niet. Terwijl de verhouding tusschen agarcultuur- bouilloncultuur-kolonies, die maltose al of niet omzetten, bij 88a en 78b uit de 37° C. stoof en ook nog bij 78a uit de

22° C. stoof voldoende opheldering geeft van de resultaten op tabel II vermeld, blijft die van 77b duister.

Uit het geheel valt op te maken dat het blijven staan der culturen zeker niet totaal onverschillig is, maar dat vooral de temp. en de aard van den voedingsbodem invloed hebben. In den bouillon schijnen bij 78b en 88a de Y-elementen veel beter te kunnen groeien dan de FLEXNER-elementen.

Duidelijk wordt nu ook een enkel wisselvallig teeken uit tabel I. Zoo werd b.v. van stam 88a na Januari 1918 driemaal met een interval van ongeveer telkens een maand volgens de plaatmethode een twintigtal kolonies in maltose geënt. Tweemaal werd gevonden 18 negatief en 2 positief en eenmaal 17 negatief en 3 positief. Hieruit blijkt dat bij overenten met hoogstens 8 dagen tusschenruimte de verhouding toen niet noemenswaard bij dezen stam gewijzigd is. Dat ze vroeger wel veranderd is, is uit tabel I te zien. Dit zou misschien een aanwijzing kunnen zijn, waarom laboratoriumstammen soms omslaan. Of dit echter een volledige verklaring is moet ik op grond van latere proeven ontkennen. Van stam Hiss-RUSSEL was de verhouding van 20 eencelkolonies 16 negatief en 4 positief. Ook deze stam is naar tabel I aangeeft een weifelende die na eenmaal 24 uur een $\pm$ teeken heeft.

Uit dit onderzoek blijkt echter één zaak duidelijk: Indien men op een atoxische dysenterie-stam het FLEXNER- of Y-etiket wil plakken moet men, liefst een paar maal, met een éencelcultuurmethode nagaan of de stam niet uit verschillende elementen is samengesteld.

Dezelfde overwegingen moeten ons leiden bij de beoordeeling der agglutinaties. Immers wij zullen een

konijn immuniseeren met een FLEXNER-stam en tegelijk een vrij groot aantal Y-elementen inbrengen. Als wij dit nu als een zuiver FLEXNER-serum beschouwen, krijgen wij tegenstrijdige resultaten. Bovendien weten wij niet of niet de Y-elementen in veel sterker mate agglutinininen kunnen opwekken dan de overmaat FLEXNER-elementen.

Ik wil in dit verband wijzen op de proeven van HEHEWERTH, die zijn agglutinaties deed met een serum bereid met stam 77b. Uit tabel I is de variabiliteit van dezen stam te zien en dit blijkt nog duidelijker uit tabel II en III en uit nog later te vermelden proeven.

Ik heb getracht te zoeken naar morphologische verschillen tusschen de gelatineplaatkolonies om te zien of daaruit reeds op te maken viel of wij met Y- of FLEXNER-elementen te doen hebben. Dit is mij niet gelukt. Als ik meende morphologische verschillen te zien (b.v. in de kolonies van 78b, 88a) dan bleek dat niet saam te gaan met verschil in reactie t.o.v. maltose.

Zoo is dus gebleken dat het laten staan van culturen op zich zelf van weinig invloed is (c.f. BAERTHELEIN). Dat de temp. in zooverre invloed heeft, dat lage temp. (8° C.) alle verandering tegenhoudt en dat hoogere temp. (22° C. en 37° C.) variatie toelaat, maar niet in het oog vallend bevordert. Verder dat de aard van den voedingsbodem niet onverschillig is.

HOOFDSTUK VI.

INVLOED VAN DEN GROEI IN WEEFSEL- VOCHTEN OP DE VERANDERLIJKHEID VAN ATOXISCHE DYSENTERIE-BACILLEN.

Toen het schema van LENTZ aangevallen werd op grond van de waarneming, dat een Y-stam soms een FLEXNER-stam werd, heeft LENTZ zich verdedigd door de mededeeling dat dit alleen oude laboratorium-stammen gold (zie echter HEHEWERTH). Hij heeft toen BERNHARDT en MARKOFF 1) een oude Y-stam, die nu maltose omzette, laten inbrengen bij apen. Uit de faeces kweekten zij weer een Y-stam. De veronderstelling was, dat de darm de normale vindplaats der dysenteriebacillen is en dat in de buitenwereld, waar ze niet thuis hooren, modificaties ontstaan, die in het oude voedingsmilieu spoedig verdwijnen.

Deze proeven waren voor Prof. v. LOGHEM aanleiding mij voor te stellen de veranderlijkheid der door mij in onderzoek genomen dysenteriebacillen niet slechts op kunstmatige voedingsbodems, doch ook, met behulp van collodiumzakjes, in *weefselvochten* na te gaan.

De ingenieuze collodiumzakjesmethode danken wij aan de Fransche school. METCHNIKOFF, ROUX, TAURELLI-SALIMBENI 2) hebben in het „Institut PASTEUR” te Parijs deze

1) Centralblatt für Bakteriologie. Abt. 1. Or. Bd. 28, H. 19. 1900.

2) Annales de l'Institut Pasteur 1896 No. 5.

methode bedacht en gebruikt om daardoor de virulentie van bacillen te verhoogen. Naast collodiumzakjes heeft men verder gebruik gemaakt van filtreerpapier, celloidine, dunne darm van den kikvorsch en de schil van enkele rietsoorten (*Phragmites communis*).

Al deze stoffen laten (in voldoende dikte) vloeistof met daarin opgeloste bestanddeelen snel dialyseeren, maar houden bacillen tegen. Collodium b.v. dialyseert in ruim vier uur evenveel magnesiumsulfaat 1) t.o.v. stroomend water als perkament in zeven tot acht dagen (GORSLINE) 2).

De wijze van vervaardiging zooals die te Parijs gedaan wordt en door Prof. v. LOGHEM mij werd gedemonstreerd, is zeker een zeer eenvoudige.

Ik ging daarvoor als volgt te werk:

Een hoeveelheid collodium clasticum, van de Pharmac. Handelsver. betrokken, werd tot een hoogte van ongeveer 10 c.M. in een wijdmondsche potje gegoten. Hierin werd een agglutinatiebuisje met den bodem ingedompeld tot ongeveer 6 c.M. diepte, voorzichtig eruit gehaald en het overtollige collodium gelegenheid gegeven er af te druipen. Dit werd driemaal herhaald en nu, nadat het collodium er niet meer in druppels afvloeide, het buisje snel omgekeerd, zoodat de laatste druppel zich weer over het buisje uitbreidde. Daarna werd met de blaasvlam of met den mond ongeveer een halve minuut krachtig tegen het collodium geblazen, dat nu hard en wit wordt. Als men nu nog het bovenste randje van het zakje, dat rond het buisje zit, met nagel of mes verwijdt, kan men makkelijk met de volle hand het zakje van het buisje afschuiven en met den mond

1) Zie verder Centralblatt für Bakteriologie, Abt. I, Bd. 20 blz. 380. 1896.

2) Centralblatt für Bakteriologie, IIe Abteilung, Bd. 8, blz. 498. 1902.

weer opblazen. Nu is het zakje gereed. Als men het een paar maal gedaan heeft, mislukt zelden een zakje. Is het collodium erg dun en vloeibaar dan moet men een keer meer indompelen en een halve minuut langer blazen.

Ook hierbij heeft ieder zijn eigen methode.

GORSLINE 1) maakt in den bodem van het agglutinatiebuisje een gaatje. Omtrekt dit eerst zorgvuldig met collodium en maakt dan op de boven beschreven wijze het zakje verder af, maar hij vult nu het buisje met water van ongeveer 25° C. en blaast dit door het geboorde gaatje tusschen zakje en buisje en laat op deze wijze het zakje van het buisje schuiven.

W. D. FROST 2) vult het buisje met collodium en keert het om. Het collodium druipt eruit, maar er blijft een voldoende laagje voor een zakje in het buisje achter. Dit wordt gedroogd en daarna weer met warm water verwijderd, als het al niet spontaan loslaat. SIDNEY WOLF 3) voegt aan het collodium 1 % oleum ricini 4) toe om kleine scheurtjes te voorkomen. Variis modis bene fit.

Om gemakkelijk met het zakje te werken bevestigt men er nu een glazen fleschje aan. Een glazen buisje van ongeveer vier m.M. diameter wordt aan één einde uitgetrokken, tot een opening van ongeveer 2 m.M. is verkregen. Dit eind wordt dichtgesmolten tot een rood bolletje en nu snel opgeblazen waardoor het bolletje een ballon wordt, die meest springt. Het inplantingsrandje van dezen ballon op het buisje blijft staan. Het geheel lijkt nu op een champagneflesch

1) Centralblatt für Bakteriologie, IIe Abteilung, Bd. 8, blz. 498. 1902.

2) Centralblatt für Bakteriologie. Bd. 34, blz. 733. 1903.

3) Centralblatt für Bakteriologie. Bd. 20, blz. 380. 1896.

4) Collodium elasticum volgens de Pharmacopee bevat 2 % ol. ricini.

zonder bodem, waarbij de hals bij de kurk een flinke kraag heeft. Die hals met kraag wordt in het collodium-zakje een eindje ingeschoven en vlak vóór het kraagje wordt het zakje met zijde stevig om den hals van het champagnefleschje vastgesnoerd. Overtollige zijde en resten van het zakje worden afgeknipt en nu heel voorzichtig onder voortdurend blazen deze las van ongelijksoortige stoffen met collodium toegemetseld. Nu wordt het zakje onder water gehouden en krachtig in het buisje geblazen om te zien of alles luchtdicht is.

Daarna wordt gesteriliseerd. Het beste is sterilisatie in alcohol.

Met een schoone RECORD-spuut wordt alcohol 60—96 % in het zakje gespoten en dit in een fleschje met denzelfden alcohol gedompeld. Na 24 uur is het voldoende steriel. Met een steriele RECORD-spuut wordt nu de alcohol uit het zakje uitgezogen en met dezelfde spuit het zakje driemaal met physiol.zoutsolutie gevuld en leeggezogen. Nu is ook de alcohol, als het vullen een beetje overvloedig geschiedt, voldoende verwijderd en kan men er met dezelfde spuit bouillon inbrengen, waarin de verlangde stam 24 uur bij 37° C. gegroeid is. Het zakje wordt niet geheel met bouillon gevuld, omdat anders het dichtsmelten van het champagnefleschje moeilijk gaat. Dit wordt namelijk voorzichtig zoo dicht mogelijk bij den hals in de blaasvlam dicht gesmolten. Het dichtgemaakte collodiumzakje wordt in de peritoneaalholte van een proefdier ingebracht.

Tweemaal heb ik tijd en moeite verloren door een andere wijze van steriliseeren. Ik dacht dat de bovenstaande sterilisatie niet voldoende zou zijn en nam daarom sublimaat. Twintig zakjes werden na deze sterilisatie bij cavia's en ratten ingebracht. Na drie

weken bleken alle zakjes steriel te zijn. Omdat ik de zakjes nooit zoolang intraperitoneaal had gelaten, meende ik dat de bactericide eigenschap der weefselvochten de zakjes had gesteriliseerd en herhaalde de proef. Nu echter was ook na 4 dagen reeds de inhoud van het zakje steriel en kwam ik op het denkbeeld, dat sporen sublimaat, in het collodiumzakje achter gebleven, van invloed waren. Het bleek nu dat een gevuld zakje, ook buiten het lichaam, in ongeveer 48 uur steriel werd door deze sporen sublimaat.

De cavia's werden onder chlooraethylnarcose opgespannen, de buikharen weggeknipt, gewassen, geschoren en daarna met tinct. jodii ingesmeerd. De narcose werd gegeven door een wijdmondsche potje, waarin met aether gedrenkte watten lagen, over het snuitje van het dier te brengen. Bij cavia's is de aether te verkiezen boven chloroform. Ratten daarentegen kan men zeer makkelijk of nog beter met chloroform bedwelmen.

Nu werd in den buik een kleine snede gemaakt door huid en spier en voorzichtig het peritoneum geopend. Het zakje werd ingebracht (later werden altijd twee zakjes in één proefdier gebracht) en nu in twee hechtingen (een peritoneum-spiechechting en een huidhechting) de buik gesloten. De wond wordt met tinct. jodii en daarna nogeens met collodium bebestreken. Na een paar uur loopt het dier rond of er niets gebeurd is. Nooit heb ik één proefdier aan peritonitis verloren. Wel verscheidene door de narcose.

Het verloop en de resultaten van het onderzoek kunnen als volgt worden samengevat.

Zie Tabel IV. Pag. 53.

TABEL IV.

	Lactose.		Glucose.		Manniet.		Maltose.		Saccharose	
	Na 24 uur.	Na 72 uur.	Na 24 uur.	Na 72 uur.	Na 24 uur.	Na 72 uur.	Na 24 uur.	Na 72 uur.	Na 24 uur.	Na 72 uur.
74b (vóór de proef).....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
74b ca 1 (na 7 dagen)....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
74b ca 2 (na 13 dagen)...	Verontreinigd met enterococcus.									
74b ca 2a (na 13 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
74b ca 2b (na 13 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
74b ca 2c (na 13 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
74b ca 2d (na 13 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
77b (vóór de proef).....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
77b ca 1 (na 7 dagen)....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
77b ca 2 (na 13 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
88a (vóór de proef).....	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
88a ca (na 9 dagen).....	Verontreinigd met enterococcus.									
88a ca a (na 9 dagen)....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
88a ca b (na 9 dagen)....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
88a ca c (na 9 dagen)....	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
Strong (vóór de proef)....	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
Strong ca (na 14 dagen)...	Verontreinigd met enterococcus.									
Strong ca a (na 14 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
Strong ca b (na 14 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
Strong ca c (na 14 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
Strong ca d (na 14 dagen)...	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
Strong ca e (na 14 dagen)...	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
Flexner (Král) vóór de proef)	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
Flexner(Král)ca(na 13 dagen)	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—

Stam 74b is een „Y”-stam van Dr. HEHEWERTH, die bij het voortgezet onderzoek (zie tabel I) en bij de lang bewaarde agar en bouillonproeven (zie vroeger) zijn Y-eigenschappen *onveranderd had bewaard*. Een collodiumzakje met een 24 uur oude bouilloncultuur werd op 25 Januari in de buikholte van een cavia gebracht. Na 7 dagen werd het zakje weer opgezocht;

de inhoud bleek niet verontreinigd doch de reacties met de koolhydraten waren onveranderd.

Eenige dagen later — op 5 Februari — werd stam 74b, die nu reeds éénmaal de cavia was gepasseerd (aan te duiden als 74b_{ca 1}) opnieuw in de buikholte van een cavia gebracht. Na 13 dagen weer voor den dag gebracht was de stam 74b_{ca 2} verontreinigd met een enterococcus. Na zuiver kweken uit 4 koloniën 1) (74b_{ca 2} a, b, c, d, zie tabel IV) zette dit viertal zonder uitzondering maltose om.

Hier is dus een stam, die sinds jaren als Y-stam zich had gedragen na twee malen een cavia gepasseerd te zijn in het FLEXNER-type omgeslagen.

Stam 77b is een stam van Dr. HEHEWERTH die zich aanvankelijk als een FLEXNER had gedragen, doch later na de Kerstvacantie Y-stam werd en bleef (zie tabel I). In tabel III ziet men hoe de agarculturen bij 37° en 22° C. uitsluitend kolonies van het Y-type opleverden (maltose negatief), terwijl van de bouillonculturen slechts 1 van 20 kolonies de maltose omzette.

De dierpassage van 77b (geheel Y-type) leverde in hoofdzaak Y-elementen 2); na ten tweede male de cavia gepasseerd te zijn bleek 77b weer geheel teruggeslagen tot FLEXNER.

77b_{ca 2} is sindsdien herhaalde malen door splitsing op de gelatineplaat gecontroleerd en leverde steeds 100 % FLEXNER-kolonies.

1) Door middel van de gelatineplaat en met inachtneming van alle eischen aan de determinatie van dysenteriebacillen te stellen. De enterococcus was grampositief en zette lactose om.

2) De cultuur als geheel zette eerst maltose niet om (alle 20 kolonies van de gelatineplaat op maltose negatief); later vond ik op 20 kolonies 1 positieve en 19 negatieve maltoseomzetters.

Stam „Strong” heeft zich (blijkens tabel I) niet anders dan als Y-stam gedragen. Na éénmaal dierpassage, waarbij eveneens verontreiniging met een enterococcus optrad, waren 3 van 5 kolonies van het FLEXNER-type. De stam STRONG was mij namelijk zeer goed bekend, daar ik dezen herhaaldelijk met de gelatineplaat door afenting in maltose had gecontroleerd, omdat de stam mij diende voor de bereiding van een mijner „Y”-sera (zie volgende Hoofdstuk). Vóór de dierpassage dus constant van 20 kolonies geen enkele van het FLEXNER-type, na de dierpassage van 5 kolonies, 3 van het FLEXNER-type.

Naast deze drie stammen, waarbij dus een opmerkelijke omslag of terugslag was verkregen van Y-type tot FLEXNER-type, kan ik eenige stammen vermelden, bij welke de groei in de weefselvochten geen invloed heeft gehad op het vermogen koolhydraten om te zetten. Stam 88a werd geïsoleerd als Y-stam (zie tabel I), zette daarna een tijdlang maltose om, verloor en herwon deze eigenschap. Bij splitsing bleek de stam herhaaldelijk uit FLEXNER-elementen te bestaan, die evenwel in oude bouillonculturen bij 37° C. te loor gingen (tabel III). Na dierpassage waren de Y-elementen nog naast de FLEXNER-elementen aanwezig. Stam FLEXNER (KRAL) handhaafde tijdens de dierpassage zijn FLEXNER-type.

Uit deze proefnemingen blijkt dat wij in de levende middenstof een hulpmiddel hebben bij bepaalde stammen de variatie in een bepaalde richting te begunstigen. De resultaten bij 74b, 77b en STRONG zijn in dat opzicht sprekend. Ook brengen zij een ongedwongen verklaring voor het feit dat men tezelfder tijd of op verschillende dagen uit de faeces van een patient verschillende stammen kan afzonderen (zie

b.v. tabel I, de 5 stammen 78a, b, c, d en e, door HEEWERTH uit één geval verkregen).

Voorts is mijn resultaat in tegenspraak met de meening van LENTZ en WINTER, dat bacillen pas uit het lichaam gekweekt, beter in staat zijn eiwit om te zetten dan koolhydraten. Immers bovengenoemde stammen, die na de dierpassage wel maltose omzetten zijn voorbeelden van het tegendeel.

In het volgende hoofdstuk heb ik weergegeven, hoe ik eenige der verkregen varianten aan een serologisch onderzoek heb onderworpen, teneinde de vraag te beantwoorden of het „FLEXNER” of „Y”-karakter, zooals dit bij de suikerreactie aan den dag is getreden, zich ook bij de biologische proef openbaarde.

HOOFDSTUK VII.

VERGELIJKING DER VERKREGEN VARIANTEN MET SEROLOGISCHE REACTIES.

Zooals ik reeds vermeldde, bouwt KRUSE zijn in-deeling op de agglutinatie. Behalve menig practisch bezwaar is reeds de onmogelijkheid gebleken vele bacillen in het schema van KRUSE onder te brengen. Zoo schrijft b.v. MESSERSCHMIDT 1): Unser Bestreben, die beobachtete Ruhrepidemie als durch einen einheitlichen Erreger verursacht anzusprechen, gelang weder nach LENTZ'scher noch nach KRUSE'scher Nomenklatur. Sprachen auch unsere ersteren Agglutinationsprüfungen dafür, dass eine einheitliche D-Epidemie vorlag, so kamen später noch H- und A-Rassen und Vertreter einiger noch nicht bekannter Varietäten hinzu.

KRUSE zelf gelooft aan het constant zijn der agglutinatie. KUENEN 2) deelt mee dat BARBER aangeeft dat 25 % dysenteriebacillen t.o.v. de suikerreactie muteert en schrijft daarna: „Daarbij blijft evenwel het receptorenapparaat voor de immuniteitsreacties onveranderd, getuige het onverminderde agglutinatievermogen. Er is m. i. geen reden om niet aan te nemen dat deze mutatie niet even goed in de vrije natuur of in het lichaam van den patient zou kunnen plaats hebben

1) Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. 85, H. 2, 1918.

2) Geneesk. Tijdschrift voor Ned-Indië. 1915.

en dat dus de FLEXNER-stammen, die wij uit de faeces isoleeren, gemuteerde Y-stammen voorstellen, indien zij met Y-serum hoog agglutineeren". Daartegenover wil ik stellen de reeds vermelde proeven van BAERTHLEIN (blz. 31). Deze agglutineerde tegenover een konijnen-FLEXNER-serum twee kleurlooze, doorschijnende kolonies van een Y-stam en twee bijbehorende gele, ondoorschijnende kolonies. De eerste soort agglutineerde tot den titer (I : 6000) en de tweede niet eens I : 100. Maakte hij een serum met de eerste soort (titer I : 6000), dan agglutineerde de andere soort in het geheel niet tegenover dit serum.

Juist diezelfde resultaten hebben BORDET en SLEESWIJK 1) bij kinkhoest-bacillen verkregen en EISENBERG 2) bij *B. coli mutabile*.

Dit zijn dus feiten die aantoonen dat morphologische mutaties gepaard kunnen gaan met verandering in agglutinatie en dus „het receptorenapparaat voor de immuniteitsreacties" niet constant is.

't Was nu natuurlijk voor mij de vraag: Zie ik gelijktijdig met de verandering der suikerreactie ook een verandering in agglutinatie?

Voor ik deze vraag beantwoord, een enkel woord over de gevolgde techniek.

LENTZ 3) vermeldt dat paarden sterk bij-agglutininieren voor alle groepen vormen (ook bij immuniseeren met SHIGA-KRUSE-bacillen), geiten minder sterk (KUENEN werkte met geitenserum) en konijnen het minst. Bij immuniseeren met een a-toxische bacil vormen zich

1) Annales de l'Institut Pasteur. 1910.

2) Centralblatt für Bakteriologie. Abt. 1. Bd. 80. H. 7. 1918.

3) l. c. in KOLLE en WASSERMANN.

echter ook bij konijnen bij-agglutinen, bij immuni-seeren met SHIGA-KRUSE-bacillen niet 1).

Het best beviel mij de volgende wijze van immu-niseeren van konijnen.

Bij de atoxische dysenteriebacillen wordt de eerste maal $\frac{1}{6}$ van een buisje 24-uur oude schuine agar-cultuur levende bacillen in één c.c. P.Z. in de oorvena van het konijn ingespoten. In het buisje wordt 6 c.c. P.Z. gebracht en hiermee krachtig geschud. Desnoods wordt nog met de platinanaald nagewreven. Na 7 dagen wordt nu $\frac{1}{4}$ of $\frac{1}{3}$ cultuur levende bacillen ingebracht, al naar gelang van het gewicht van het dier na de eerste inspuiting. Na nog een week wordt $\frac{1}{2}$ of $\frac{2}{3}$ cultuur ingespoten en nu is de titer na weer een week meestal hoog of zelfs zeer hoog. Eenmaal vond ik 1 : 40.000. In het begin begon ik met $\frac{1}{6}$ cultuur $\frac{1}{2}$ uur op 60° C. verhit. Dit bleek mij over-bodig te zijn (zie LENTZ).

Bij de SHIGA-bacillen begint men met $\frac{1}{300}$ normaal-oogje levende bacillen, na een week $\frac{1}{50}$ oogje en na nog een week $\frac{1}{10}$ oogje (zie LENTZ).

Voor de agglutinatie werden de verdunningen met bacillen 6 uur in de broedstoof bij 37° C. gelaten. Meest werd dan afgelezen na 24 uur. Een enkele maal dadelijk als ze uit de stoof kwamen.

MARTINI en LENTZ 2) laten alles 20—24 uur in de broedstoof bij 37° C. en lezen dan dadelijk af. Zij raden ook aan te schudden vóór het aflezen, omdat dysenteriebacillen gaarne spontaan uitzakken en saam-

1) Prof. DE JONG vermeldt in het Tijdschrift voor vergelijkende Ge-neeskunde, Deel IV, afl. I, 1908, dat normale konijnen soms zeer hoogen titer voor atoxische dysenteriebacillen hebben. Ik heb dit niet ervaren.

2) l. c. in KOLLE en WASSERMANN.

klonteren. Echte agglutinatievlokjes zijn door schudden te onderkennen; door krachtig schudden laten zij zich niet fijn verdeelen, in tegenstelling met een gewoon bezinksel. Er werd altijd macroscopisch nooit microscopisch afgelezen. MARTINI en LENTZ en anderen raden ook zeer af het agglutineeren in den hangenden druppel, wegens de neiging van dysenteriebacillen spontaan hoopjes te vormen. KRUSE deed de agglutinatie altijd in den hangenden druppel en nam daarvoor bouillon-culturen. Hij las af na drie tot vier uur en bij negatief resultaat nog eens na twintig uur.

Nu enkele mijner agglutinaties. Er werd slechts een enkele agglutinatie gedaan om na te gaan of SHIGA-bacillen inderdaad niet met „a-toxische” sera agglutineeren. Dit werd bevestigd. Hier volgt nu de uitslag van eenige proeven met suikervarianten.

AGGLUTINATIE I (27 Februari 1918).

	Serum konijn 17a (stam Flexner Krål).								Serum konijn 21a (stam Hiss-Russel).					
	c.	50	100	250	500	1000	2000	4000	50	100	250	500	1000	2000
77b	—	clar.	clar.	+	±	—	—	—	clar.	clar.	clar.	++	±	—
77b ca. 1	—	clar.	clar.	++	+	±	—	—	clar.	clar.	clar.	+	±	—
77b ca. 2	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	+	±	—

clar. = clarificatie, ++ sterke agglutinatie, + duidelijke agglutinatie, ± zwakkere agglutinatie, ± geringe agglutinatie, — geen agglutinatie.

Keurig is te zien het verschil tusschen de Y-stam 77b en zijn FLEXNER-variant 77b ca. 2; 77b ca. 1, die zoowel „Y”- als „FLEXNER-element bezat, neemt een tussenstelling in. 77b ca. 2 begon al na tien minuten sterk te agglutineeren!! Ook heel fraai demonstreert hier stam HISS-RUSSEL, waarmee konijn 21a is

geïmmuniseerd, zijn gemengd karakter. Alle drie agglutineeren tot ongeveer dezelfde verdunning.

AGGLUTINATIE II (6 Maart 1918).

	Serum konijn 21b (stam Flexner Krål).						Serum konijn 18a (stam Strong).					
	c.	100	250	500	1000	2000	100	250	500	1000	2000	
74b.....	—	clar.	±	—	—	—	clar.	+	±	±	—	—
74b ca. 1.....	—	clar.	±	—	—	—	clar.	+	±	—	—	—
74b ca. 2a.....	—	clar.	+	±	—	—	clar.	+	±	—	—	—
74b ca. 2b.....	—	clar.	clar.	+	±	—	clar.	+	±	—	—	—
74b ca. 2c.....	—	clar.	clar.	+	±	—	clar.	clar.	+	±	—	—

Een minder duidelijk maar toch nog opvallend verschil.

AGGLUTINATIE III (7 Maart).

	Serum konijn 18a („Y” stam Strong).						Serum konijn 21b (stam Flexner Krål).					
	c.	100	250	500	1000	2000	100	250	500	1000	2000	
77b.....	—	clar.	clar.	clar.	++	+	clar.	clar.	clar.	+	—	—
77b ca. 1.....	—	clar.	clar.	clar.	+	+	clar.	clar.	+	±	—	—
77b ca. 2.....	—	clar.	+	±	—	—	clar.	clar.	+	+	±	—

Hier geen duidelijk resultaat met serum 21b.

AGGLUTINATIE IV (25 April).

	Serum konijn 21b (stam Flexner Krål)								Serum konijn 20 („Y” stam Strong).							
	c.	100	250	500	1000	2000	4000	10.000	100	250	500	1000	2000	4000	10.000	
Flexner (Krål)	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	++	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	++	—	—
Strong.....	—	clar.	clar.	clar.	clar.	++	+	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.
77b.....	—	clar.	clar.	++	+	—	—	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.
77b ca. 2....	—	clar.	clar.	++	++	++	+	±	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	++
74b.....	—	clar.	clar.	clar.	++	+	—	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.
74b ca. b....	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	+	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.
78b ag. 37° C.	—	clar.	clar.	clar.	+	+	—	—	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.	clar.
78b bo. 37° C.	—	clar.	clar.	++	+	±	—	—	clar.	clar.	++	++	+	+	+	—

AGGLUTINATIE V (6 Juni).

	Serum konijn 18b (stam Flexner Krål).							Serum konijn 17b („Y” stam Strong)						
	c.	100	250	500	1000	2000	4000	100	250	500	1000	2000	4000	
Flexner (Krål)....	—	clar.	clar.	clar.	++	+	±	+	—	—	—	—	—	
Strong.....	—	clar.	clar.	++	+	—	—	clar.	clar.	+	+	—	—	
74b.....	—	clar.	clar.	clar.	++	+	—	+	—	—	—	—	—	
74b ca. 2a.....	—	clar.	clar.	clar.	clar.	+	+	+	—	—	—	—	—	
77b.....	—	++	++	+	—	—	—	++	++	+	—	—	—	
77b ca. 2.....	—	clar.	clar.	clar.	++	+	±	+	±	—	—	—	—	
88a.....	—	clar.	clar.	+	—	—	—	clar.	clar.	+	±	—	—	
88a ca. c.....	—	clar.	clar.	+	+	—	—	clar.	++	±	—	—	—	

Konijn 17b was tweemaal ingespoten. De eerste maal met $\frac{1}{6}$ cultuur en na zeven dagen met $\frac{1}{5}$ cultuur levende bacillen en was volkomen gezond en tierig. De agglutinatie werd echter een maand later gedaan, omdat KRUSE zegt dat in oude sera de bij-agglutinenen verdwenen zijn. Bij serum konijn 18b merkte ik daar echter niet veel van. Ook wilde ik beproeven of de verschillen mooier werden door sera met lager titer te bezigen. Ook dit is niet geschied.

AGGLUTINATIE VI (6 Juni).

	Serum konijn 21b (stam Flexner Krål)							Serum konijn (stam Strong).					
	c.	100	250	500	1000	2000	5000	100	200	500	1000	2000	5000
74b.....	—	clar.	clar.	++	+	—	—	clar.	clar.	clar.	+	+	—
74b ca. 2b.....	—	clar.	clar.	clar.	++	+	—	clar.	clar.	clar.	+	—	—
77b.....	—	±	—	—	—	—	—	clar.	clar.	clar.	clar.	+	±
77b ca. 2.....	—	++	+	+	—	—	—	clar.	clar.	clar.	+	±	—

Uit het verslag van bovenstaande agglutinatieproeven komt, dunkt mij, aan den dag, dat de verschuiving die mijn stammen in biochemisch opzicht (van Y-type tot FLEXNER) hebben doorgemaakt zich in

een aantal gevallen ook bij biologisch onderzoek openbaart. Als regel vindt men toch in de tabellen dat de FLEXNER-elementen (74b_{ca 2}, 77b_{ca 2}, 88a_{ca c}) in hoogere mate met FLEXNER-serum worden geagglutineerd dan de „Y”-elementen (74b₁, 74b_{ca 1}, 77b_{ca 1}, 78b_{ag 37° C.}, 78b_{bo 37° C.} en 88a).

* * *

Uit een practisch oogpunt zijn de beschreven resultaten in zooverre bevredigend, dat zij aan zekere moeilijkheden in de praktijk der aetiologische diagnose der bacillaire dysenterie wel tegemoet komen. Kweekt men b.v. bij een patient Y-bacillen uit de faeces, terwijl het serum van dezen zieke de FLEXNER-stammen van het laboratorium fraai agglutineert, doch op den eigen stam (door „Y”-sera wel agglutinelabel) nagenoeg geen invloed heeft 1), dan vindt deze vondst in de experimenteel waargenomen verandering van het eene type in het andere wel toelichting.

Theoretisch zijn zij een steun voor de opvatting van BORDET 2): qu'au moins pour ce qui concerne le pouvoir agglutinant, les immunserums ne portent point leur action sur des substances fondamentales, inhérentes à la vie, dont la présence est nécessairement liée à la nature, à la constitution même de l'espèce, mais sur des matières en quelque sorte accessoires, d'apparition possible mais facultative, dont l'élaboration ne fait nullement partie du faisceau des caractères héréditaires immuables qui donnent à l'être vivant sa physionomie propre et son autonomie.

1) Prof. VAN LOGHEM deelde mij een zoodanig geval uit zijn ervaring mede.

2) Annales de l'Institut PASTEUR. 1910.

In dit verband komt dan een nieuwe vraag op, of er andere immuniteitsreacties zijn, die nu wel de „constitution même de l'espèce” raken. En in het bijzonder denkt men dan aan de complementbindingsproef volgens BORDET-GENGOU, die ook volgens BORDET zelve in ons geval in staat zou zijn de verwantschap der verschillende culturen aan te toonen.

Voor het doel dat ik mij gesteld had: de veranderlijkheid van eenige atoxische dysenteriebacillen nader te onderzoeken, had de beantwoording van deze nieuwe vraag geen rechtstreeksch belang, daar ik de verwantschap der door mij onderzochte varianten uit den aard der zaak niet betwijfel. Wel zou ik er van kunnen verwachten, in het geval BORDET's uitspraak niet bevestigd werd een gegeven omtrent de mogelijkheid dat het agglutinogene apparaat met dat der „substances sensibilisatrices” gelijkelijk varieert.

Op een aantal proeven in die richting ondernomen zal ik hier niet uitvoerig ingaan; niet zoozeer, omdat zij eenigszins meer naar een ander vraagstuk gericht zijn, dan wel omdat, wilde ik dit werk voortzetten, de methodiek een omwerking vereischte, die mij te ver zou voeren.

Een enkel resultaat moge ik toch vermelden. Het betreft de reeds meer in deze bladzijden genoemde stam 77b („Y”-type),
 stam 77b_{ca 2} (FLEXNER-type).

Van deze stammen zijn „antigenen” bereid met behulp van antiformine; zij werden zoodanig verdund dat zij in de voorproef zonder amboceptor evenveel complement bonden, en nu tegenover een dubbel stel sera („Y”, „FLEXNER” en normaal) onderzocht. Dit onderzoek geschiedde met stijgende hoeveelheden

complement, met haemolytisch konijnenserum en schapenbloedlichaampjes als haemolytisch systeem.

COMPLEMENTBINDINGSPROEF (14 Juni 1918).

Complementhoeveelheden.	0.01	0.015	0.02	0.025	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07
Titratie antigeen 77b:.....	—	—	±	+	+				
" " 77b ca. 2.....	—	—	±	+	+				
" haemolytisch systeem.....	—	—	±	+	+				
Antigeen 77b met normaal serum.....	—		±		+	+	+	+	+
" 77b " Y-serum (Strong).....	—		—		—	—	±	±	+
" 77b " Flexner-serum (Flexner Krål)	—		—		—	—	±	±	+
" 77b ca. 2 met normaal serum....	—		—		+	+	+	+	+
" 77b ca. 2 " Y-serum (Strong)...	—		—		—	±	+	+	+
" 77b ca. 2 " Flexner-serum (Flexner Krål).....	—		—		—	—	—	±	+

— geen haemolyse; ± een spoor; ± geringe haemolyse; + volkomen haemolyse.

Hier is het verschil wel duidelijk: 77b, de oude „Y”-stam remt bij aanwezigheid van Y-serum de haemolyse meer dan bij aanwezigheid van het FLEXNER-serum, terwijl 77b_{ca 2}, de uit de cavia verkregen FLEXNER-stam juist het omgekeerde te zien geeft. Dit zou dus, in tegenstelling met BORDET's opvatting in overeenstemming zijn met die van ALTMANN en RAUTH 1), die op phenol-agar verkregen coli-varianten bij complementbindingsproeven zich van den moederstam zagen onderscheiden.

1) Zeitschrift für Immunitätsforschung, 1910. Bd. 7.

BESLUIT.

Op grond van den uitslag mijner proefnemingen acht ik een indeeling der atoxische dysenteriebacillen naar soorten aan de hand van agglutinatieproeven en koolhydraatreacties niet gerechtvaardigd. Door de sterke veranderlijkheid dezer organismen kan de *schijn* eener veelheid worden gewekt. Ik sluit mij dan ook aan bij hen die meenen dat de soortbepaling van de vertegenwoordigers der atoxische groep eerst mogelijk zal zijn na het verkrijgen van een volledig inzicht in de uitingen hunner variabiliteit en de voorwaarden, die deze bepalen.

Hierin ligt opgesloten dat de toeneming der kennis omtrent variabiliteit bij micro-organismen in het algemeen aan het vraagstuk, dat mij bezighield, zeer ten goede zal komen. De oneenigheid op terminologisch gebied heeft eerst dan kans te verdwijnen.

Wat de door mij bestudeerde verschijnselen betreft, meen ik dat deze behooren tot het gebied der adaptatie (Reizauslösung) volgens PRINGSHEIM. De omstandigheden waaronder de stammen zijn verkregen sluiten niet in absoluten zin mengculturen uit; de algemeene ervaring, ook van anderen en de verdere bij het onderzoek verkregen resultaten wijzen er toch op dat uit éénzelfden stam FLEXNER- of Y-elementen kunnen ontstaan, die voortgekweekt lang hun bijzondere eigenschappen standvastig bewaren.

Dat deze veranderlijkheid dieper gaat dan misschien uit de gewijzigde functie ten opzichte van het omzetten der koolhydraten zou kunnen worden afgeleid, blijkt uit het biologisch onderzoek, dat, tenminste wat de agglutinatieproeven betreft, niet twijfelachtig uitviel.

Aanvaardt men het begrip mutatie voor de bacteriologie, dan is er in mijn geval aan progressieve mutatie: het optreden van nieuwe genen niet te denken. Ook in den zin van BEYERINCK zou men hier, waar de uitwendige omstandigheden zoo duidelijk zich laten gelden, eerder het begrip fluctuatie dan mutatie moeten toepassen. En met EISENBERG: de genotypus is niet veranderd; slechts de phaenotypus.

Met betrekking tot de indeeling der atoxische dysenteriebacillen kom ik tot dezelfde stelling als HEHEWERTH, MARTIN e. a., die ook reeds vervat lag in de opvatting van SHIGA 1); met dezen zou ik voorloopig slechts willen aanvaarden *varianten van éénen atoxischen dysenteriebacil.*

1) Zeitschrift für Hygiene. Bd. 60, H. 1. 1908.

STELLINGEN.

I.

De zoogenaamde atoxische dysenterie-bacillen zijn varianten van één soort.

II.

De soort *Entamoeba histolytica* omvat verscheidene rassen.

III.

Infectie der halslymphklieren met tuberkelbacillen van den humanen typus is secundair aan long-tuberculose.

IV.

Bij het microscopisch onderzoek van sputum op tuberkelbacillen vergenoeg men zich niet met de toepassing van één enkele methode.

V.

Bij pylorospasmus van zuigelingen is de behandelingswijze volgens Heubner te verkiezen boven die volgens Ibrahim.

VI.

Voor men prostaathypertrophie operatief behandelt, is een proef met Röntgentherapie gewenscht.

VII.

De behandeling van ablatio retinae zij een operatieve.

VIII.

De bloed-alkali-agar volgens Dieudonné is geen ideaal middel ter herkenning van cholera-vibrionen.

IX.

Voor tonsillotomie of tonsillectomie eische men strenge indicaties. Bij zangers zij de therapie van tonsillitis uitsluitend conservatief.

X.

Sectio caesarea bij eclampsie verdient slechts aanbeveling met oog op de prognose van het leven van het kind.

XI.

Voor de prognose en therapie is bij elke patiënt met syphilis onderzoek van het lumbaalvocht gewenscht.

XII.

Namen, gebruikelijk voor de verschillende vormen van variabiliteit bij hogere organismen, bezige men niet voor analoge verschijnselen bij bacteriën.

